



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**TERAPIA REGENERATIVA COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
TRATAMENTO DE LESÕES TENDINOSAS E LIGAMENTOSAS EM EQUINOS**

CÁTIA SOFIA SANTOS GREGÓRIO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

Doutor Armando Agostinho Panhanha

Sequeira Serrão

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia

de Andrade Pimenta Tilley

Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

ORIENTADOR

Dr. Manuel Argenis Torrealba

Hernández

CO-ORIENTADOR

Doutora Paula Alexandra Botelho

Garcia de Andrade Pimenta Tilley

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**TERAPIA REGENERATIVA COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
TRATAMENTO DE LESÕES TENDINOSAS E LIGAMENTOSAS EM EQUINOS**

CÁTIA SOFIA SANTOS GREGÓRIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

Doutor Armando Agostinho Panhanha

Sequeira Serrão

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia

de Andrade Pimenta Tilley

Dr. Manuel Argenis Torrealba Hernández

ORIENTADOR

Dr. Manuel Argenis Torrealba

Hernández

CO-ORIENTADOR

Doutora Paula Alexandra Botelho

Garcia de Andrade Pimenta Tilley

2012

LISBOA

*Ao meu Amor,
Obrigado por acreditares em mim e por estares sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem o apoio e a paciência das pessoas que me rodearam durante a sua elaboração.

Ao meu orientador, Dr. Manuel Torrealba, agradeço por me ter recebido de braços abertos na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center*, por todos os ensinamentos que me ofereceu durante o estágio, e principalmente por zelar pela minha segurança, já que por vezes eu não o fazia. Obrigado por dar rumo ao meu trabalho e por ter prestado todos os materiais necessários para o seu término.

À minha co-orientadora, Doutora Paula Tilley, muito obrigado por me ajudar ao responder a todas as questões que me atrapalhavam durante a elaboração do trabalho, e também por todo o esforço que fez para o rever.

Ao Mestre João Teixeira, que se revelou um bom amigo. Obrigado pela companhia que me ofereceste durante todo o estágio, por evitares que eu fizesse muita trapalhada, e por me colocares a par de todo o sistema de funcionamento da clínica *Hippiatrica*.

À Mestre Ana Ferreira, por ser um exemplo a seguir, tanto a nível profissional como pessoal. Obrigado por me acompanhares durante o estágio e por me aturares durante as viagens de carro no ambulatório.

Às minhas duas grandes colegas estagiárias, Maria Eduarda Silva e Ângela Ferreira, obrigado pela excelente companhia, pelos momentos de diversão e pelo apoio durante tempos mais difíceis. Vocês foram um grande pilar durante o nosso estágio.

Aos Médicos Veterinários e estagiários do Hospital de Equinos do Centro Militar de Educação Física e Desportos (CMEFD) por tudo o que me ensinaram durante o estágio observacional. Sem as bases em clínica de equinos que me proporcionaram eu nunca teria conseguido aproveitar a minha passagem pela *Hippiatrica*. E um especial obrigado ao Dr. João Borges por ter partilhado ensinamentos sobre medicina de equinos que mais ninguém ensinaria, por ter partilhado todos os seus casos clínicos, e por ter instigado o meu interesse na terapia regenerativa com PRP.

Obrigado à Prof. Conceição Peleteiro por ter respondido prontamente às minhas perguntas através de e-mail.

Ao Dr. Emir Chaher agradeço os ensinamentos sobre cirurgia equina e, principalmente, sobre a instrumentação cirúrgica.

Um muito obrigado aos meus pais, que sempre me apoiaram durante todo o curso, e especialmente à minha mãe que nunca deixou de me ajudar em todas as ocasiões. Sou muito grata a ambos, mesmo que não o faça entender todos os dias.

Ao meu irmão, que nunca deixou de me chatear a cabeça!

A todos os meus animais de estimação, por me fazerem companhia em todos os momentos e por serem as minhas cobaias...

E, especialmente, um obrigado ao meu namorado Fábio que teve tanta paciência para ouvir todas as minhas lamúrias e preocupações, sempre com todo o amor e carinho, durante todo o meu percurso acadêmico, e também por me dar força e acreditar em mim quando mais precisei. Muito obrigado por tudo o que me permitiste alcançar!

Terapia regenerativa com plasma rico em plaquetas no tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas em equinos

RESUMO

As lesões tendinosas e ligamentosas são comuns em equinos de alta competição porque a maioria dos tendões e ligamentos da região distal do membro equino funciona no limite fisiológico durante o exercício. Estas lesões embora contenham uma forte componente aguda e inflamatória, possuem características degenerativas como resultado da acumulação de microlesões. O animal lesionado é afastado das competições e tem que permanecer meses em recuperação. É incerto o seu retorno ao desempenho atlético inicial e existe grande possibilidade da lesão recidivar. As terapias convencionais têm demonstrado incapacidade de alterar a evolução da formação de uma cicatriz disfuncional após a lesão. Todos estes factores conduziram à investigação de terapias que promovem a regeneração do tecido ao invés da sua reparação. O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é considerado uma terapia regenerativa simples, de fácil obtenção e relativamente pouco dispendiosa. Tem como base a concentração supra fisiológica de plaquetas que, uma vez activadas, libertam factores de crescimento (FC) que estimulam a quimiotaxia, a proliferação e diferenciação celular, a neovascularização e a deposição de matriz extracelular rica em colagénio.

O PRP é utilizado nas lesões músculo-esqueléticas para auxiliar o restabelecimento das propriedades biomecânicas normais dos tecidos, ao estimular a sua capacidade regenerativa e acelerar todos os processos inerentes à sua restauração, permitindo o rápido regresso do animal à actividade desportiva com menor probabilidade de recorrência lesional. É através do exame ultrassonográfico de tendões e ligamentos que o médico veterinário confirma o diagnóstico de lesão e regista a evolução da reparação tecidular durante a reabilitação. O protocolo de reabilitação é um ponto fulcral na recuperação do animal, tendo como objectivo aumentar gradualmente a força mecânica da zona lesionada até se atingir uma força semelhante à do tecido tendinoso ou ligamentoso normal.

A presente dissertação de mestrado teve como objectivo a revisão bibliográfica de diversos estudos referidos na literatura sobre a terapia regenerativa com PRP e a verificação do seu real valor terapêutico em lesões tendinosas e ligamentosas, através da documentação de quatro casos clínicos em equinos de desporto observados durante o período de estágio.

Palavras-chave: lesões tendinosas e ligamentosas, regeneração, Plasma rico em plaquetas, factores de crescimento, exame ultrassonográfico, reabilitação

Regenerative therapy with platelet-rich plasma in the treatment of tendinous and ligamentous injuries in horses

ABSTRACT

Tendinous and ligamentous injuries are common in high competition horses because most of the tendons and ligaments of the equine distal limb work at the physiological limit during exercise. Despite the fact that these lesions have a strong inflammatory and acute component, they show degenerative characteristics resulting from the accumulation of microlesions. The injured animal is withdrawn from competition and needs several months to recover. The return to its initial athletic performance is uncertain and there is a great chance of injury recurrence. Conventional therapies have demonstrated inability to alter the evolution towards the production of a dysfunctional scar after injury. All these factors led to the investigation of therapies which promote tissue regeneration instead of tissue repair. Platelet-Rich Plasma (PRP) is considered a regenerative therapy, it's simple, easy to obtain and relatively inexpensive. It is based on a supraphysiological concentration of platelets which once activated release growth factors (GF) that stimulate cellular chemotaxis, proliferation and differentiation, neovascularization and deposition of extracellular matrix rich in collagen. PRP is used in musculoskeletal lesions to help re-establish the normal biomechanical properties of the tissues by stimulating their regenerative capacity and accelerating all processes involved in tissue restoration, allowing a rapid return of the animal to its prior sport performance with reduced probability of lesion recurrence. It is through ultrasound examination of tendons and ligaments that the veterinarian confirms the diagnosis of injury and documents the evolution of tissue repair during rehabilitation. The rehabilitation protocol is a major point in recovery because it aims to gradually increase the work load on the injured area, until it reaches a mechanical strength similar to the one found in normal tendon or ligament tissue.

This dissertation includes a bibliographic review of several studies reported in the literature on the use of regenerative therapy with PRP, and evaluates its real therapeutic value in tendinous and ligamentous injury repair through the report of four clinical cases involving equine athletes which were observed during the practical period.

Key-words: tendinous and ligamentous injury, regeneration, Platelet-rich plasma, growth factors, ultrasound examination, rehabilitation

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Caracterização funcional, estrutural, fisiológica e bioquímica dos tendões e ligamentos	4
1.1. Função anatómica	4
1.2. Estrutura anatómica e histológica	4
1.2.1. Componentes da matriz extracelular	5
1.2.2. Componentes celulares	7
1.3. Estruturas associadas	8
1.4. Irrigação sanguínea	9
1.5. Biomecânica dos tendões e ligamentos.....	10
2. Fisiopatologia da lesão tendinosa e ligamentosa	12
2.1. Tipos de lesão tendinosa e ligamentosa	13
2.2. Mecanismos de degenerescência tendinosa e ligamentosa	14
2.3. Processo de reparação dos tendões e ligamentos.....	17
2.3.1. Fase aguda (inflamatória)	18
2.3.2. Fase subaguda (proliferativa)	19
2.3.3. Fase crónica (remodelação).....	20
2.4. Tratamento médico e cirúrgico convencional.....	21
3. PRP- Plasma Rico em Plaquetas	24
3.1. Propriedades biológicas e bioquímicas do PRP	25
3.1.1. Importância das plaquetas	26
3.1.2. Factores de Crescimento	28
3.1.2.1. Factor de crescimento transformador beta.....	29
3.1.2.2. Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1	30
3.1.2.3. Factor de crescimento derivado das plaquetas	31
3.1.2.4. Factor de crescimento epidérmico	32
3.1.2.5. Factor plaquetário 4	32
3.1.2.6. Factor de crescimento endotelial vascular	32
3.2. Utilização de PRP nas lesões tendinosas e ligamentosas.....	32
3.3. Utilização de PRP em outros tecidos	36
3.3.1. Utilização em lesões musculares	36
3.3.2. Utilização em lesões articulares	36
3.3.3. Utilização em lesões ósseas	37
3.3.4. Utilização em lesões cutâneas	38
3.4. Vantagens e desvantagens do PRP	39

3.4.1. Comparação entre o PRP e outras terapias regenerativas	41
3.5. Métodos de obtenção de PRP	44
3.5.1. Características dos métodos de obtenção.....	45
3.5.2. Protocolo do método dos tubos	48
3.6. Métodos de aplicação e administração de PRP	50
3.7. Técnicas sinérgicas associadas à terapia com PRP.....	52
3.7.1. Técnicas cirúrgicas.....	52
3.7.2. Outras terapias regenerativas.....	54
4. Exame ultrassonográfico	54
4.1. Caracterização ultrassonográfica das lesões tendinosas e ligamentosas	55
4.1.1. Ecogenicidade.....	56
4.1.2. Padrão de alinhamento das fibras.....	57
4.1.3. Área de corte transversal.....	57
4.1.4. Designação de zonas ecográficas	58
4.1.5. Classificação ultrassonográfica das lesões	59
4.2. Exames ultrassonográficos de seguimento	60
4.3. Método inovador “Ultrasonographic Tissue Characterisation”	61
5. Protocolo de reabilitação física	62
III. CASOS CLÍNICOS	65
Caso Clínico 1	65
Caso Clínico 2	70
Caso Clínico 3	73
Caso Clínico 4	76
Discussão.....	80
IV. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	86
V. BIBLIOGRAFIA.....	90
VI. ANEXOS	96
Anexo 1. Total de cirurgias observadas na clínica <i>Hippiatrica Equine Medical Center</i>	96
Anexo 2. Protocolo genérico de preparação e aplicação de PRP da clínica <i>Hippiatrica Equine Medical Center</i>	97
Anexo 3. Protocolo de reabilitação após terapia com PRP da clínica <i>Hippiatrica Equine Medical Center</i>	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Equino após redução de fractura da 2ª falange do membro posterior esquerdo	3
Figura 2 - Estrutura básica do tendão	5
Figura 3 - Imagem histológica de uma ruptura do tendão flexor digital superficial vários meses depois da ocorrência	21
Figura 4 - Preparação (A) e aplicação (B) do gel PRP numa lesão cutânea localizada no membro distal de um cavalo	39
Figura 5 - Colheita de sangue da veia jugular após tosquia e limpeza asséptica do local	49
Figura 6 - Tubos de 4,5 ml após centrifugação do sangue a 120g	49
Figura 7 - Extracção de 25% do plasma adjacente à camada flogística	49
Figura 8 - Colocação do produto de todos os tubos de 4,5 ml em tubos de 10 ml	49
Figura 9 - Composto obtido após centrifugação de tubos secos de 10 ml	49
Figura 10 - Administração intralesional de PRP com o animal em estação	51
Figura 11 - <i>Splitting</i> ecoguiado do TFDS com o cavalo em decúbito lateral sob o efeito de anestesia geral.....	53
Figura 12 - Tumefacção no terço médio da região metacárpica palmar do membro anterior direito.....	65
Figura 13 - Imagens ecográficas transversais e longitudinais da extensão total da lesão no tendão flexor digital superficial do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as constantes utilizadas	66
Figura 14 - Imagens ecográficas transversais (a1 e a2) e longitudinais (b1 e b2) da zona 2A dos membros anteriores direito e esquerdo, obtidas 5 semanas após o diagnóstico, com as constantes utilizadas	67
Figura 15 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 2A do membro anterior direito, obtidas através de ecógrafo portátil, 5 semanas após a aplicação de PRP	69
Figura 16 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1A do membro anterior direito, obtidas 12 semanas após a aplicação de PRP	69
Figura 17 - Ligeira tumefacção na face palmar da região metacárpica do membro anterior esquerdo (à esquerda), observada 1 dia após lesão	70
Figura 18 - Imagem ecográfica longitudinal (a) e transversal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas no dia do diagnóstico, com as constantes utilizadas	71
Figura 19 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas 5 dias após o diagnóstico, com as respectivas constantes .	72

Figura 20 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas 9 dias após a aplicação de PRP, com as respectivas constantes.....	73
Figura 21 - Ferração fechada nos membros anteriores com deposição de silicone na zona dos talões	73
Figura 22 - Imagens ecográficas transversais da zona 3B (A) e 3C (B) do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as respectivas constantes.....	75
Figura 23 - Imagem ecográfica transversal (A) e longitudinal (B) da zona palmar da falange proximal do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as respectivas constantes	75
Figura 24 - Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A) e zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 3 meses após o diagnóstico inicial	77
Figura 25 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 2B do membro anterior esquerdo, obtidas 3 meses após o diagnóstico inicial	77
Figura 26 - Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A) e zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 3 dias após a aplicação de PRP.....	78
Figura 27 - Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A1 e A2) e da zona 2B (B1 e B2) do membro anterior esquerdo, obtidas 8 dias após a aplicação de PRP	79
Figura 28 - Imagens ecográficas longitudinais da zona 2A (A) e da zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 8 dias após a aplicação de PRP	79
Figura 29 - Imagens ecográficas transversais (a1 e b1) e longitudinais (a2 e b2) da zona 2A e da zona 2B do membro anterior esquerdo, obtidas 9 semanas após a aplicação de PRP	80

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de cirurgias acompanhadas por tipo	2
Gráfico 2 - Curva tensão-deformação.....	11

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Cirurgias do sistema músculo-esquelético observadas	2
Tabela 2 - Função dos factores de crescimento (FC) durante a reparação de tendões e ligamentos.....	29
Tabela 3 - Relação entre a concentração dos constituintes do sangue total e do PRP obtido pelo método dos tubos	48
Tabela 4 - Graus de ecogenicidade dos tecidos tendinosos e ligamentosos	56
Tabela 5 - Classificação do alinhamento das fibras de tendões e ligamentos	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD – Ácido cítrico, citrato e dextrose

ACS – *Autologous conditioned serum* (soro autólogo condicionado)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AH – Ácido hialurónico

AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides

ARN – Ácido ribonucleico

BAPN – *Beta-aminopropionitrile* (fumarato de beta aminopropionitrilo)

C⁰- graus célsius

cm² – centímetros quadrados

COMP – *Cartilage oligomeric matrix protein* (proteína da matriz oligomérica da cartilagem)

CSA – *Cross sectional area* (área de corte transversal)

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF – *Epidermal growth factor* (factor de crescimento epidérmico)

FAS – Fibre alignment score (padrão de alinhamento das fibras)

FC – Factores de crescimento

FGF – *Fibroblast growth factor* (factor de crescimento fibroblástico)

GAGs – Glicosaminoglicanos

GAGPS – Glicosaminoglicanos polissulfatados

IGF-1 – *Insulin like growth factor* (factor de crescimento semelhante à insulina-1)

IL – Interleucina

IL-1ra – Proteína antagonista do receptor da interleucina-1

kDa – quilodalton

kg – quilograma

LSB – Ligamento suspensor do boleto

MAD – Membro anterior direito

MAE – Membro anterior esquerdo

MEC – Matriz extracelular

mEq – miliequivalentes

mg – miligrama

MHz – megahertz

ml – mililitro

MPE – Membro posterior esquerdo

MSCs – *Mesenchymal stem cells* (células estaminais mesenquimatosas)

MV – Medicina Veterinária

mv – médico veterinário

ng – nanograma

OA – Osteoartrite

OCD – Osteocondrite dissecante

PCR – Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PDAF - *Platelet derived angiogenic factor* (factor angiogénico derivado das plaquetas)

PDEGF - *Platelet derived endothelial growth factor* (factor de crescimento endotelial derivado das plaquetas)

PDGF – *Platelet derived growth factor* (factor de crescimento derivado das plaquetas)

PF4 – *Platelet factor 4* (factor plaquetário 4)

pg – picograma

PPP – Plasma pobre em plaquetas

PRP – Plasma rico em plaquetas

TFDP – Tendão flexor digital profundo

TFDS – Tendão Flexor Digital Superficial

TGF-β – *Transforming growth factor beta* (factor de crescimento transformador beta)

TIMPs – *Tisular inhibitors of metalloproteases* (inibidores tecidulares das metaloproteinases)

TNF-α – *Tumor necrose factor alpha* (factor de necrose tumoral alfa)

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (factor de crescimento endotelial vascular)

μl - microlitro

% - percentagem

I - INTRODUÇÃO

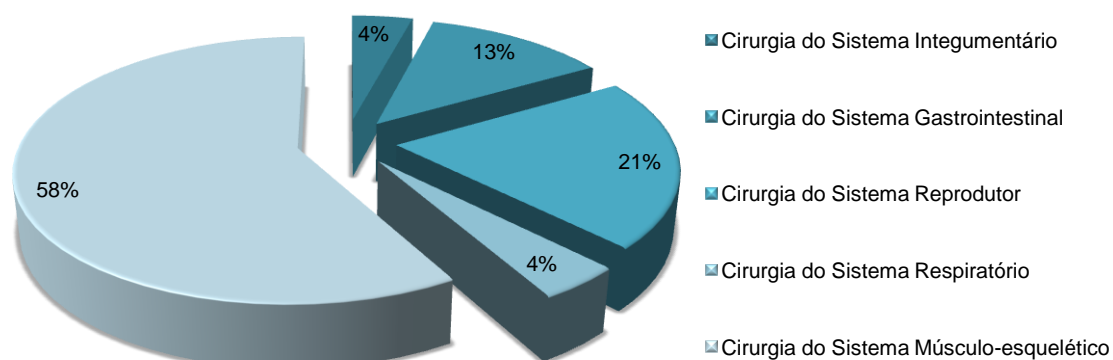
A presente dissertação foi elaborada no âmbito do estágio curricular realizado na área de clínica e cirurgia de equinos em contexto de trabalho, na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center* sob a supervisão do orientador, Dr. Manuel Torrealba. O estágio teve a duração de cinco meses, com início a 5 de Janeiro de 2011 e término a 5 de Junho do mesmo ano, incluindo dias de semana, fins-de-semana e noites, onde acompanhei todas as actividades realizadas na referida clínica em Pinheiro de Loures, em regime hospitalar.

Durante o estágio tive oportunidade de prestar auxílio nas áreas de cirurgia, internamento, tratamentos, profilaxia (vacinação, desparasitação), odontologia (limagem de dentes), realização e interpretação de exames complementares de diagnóstico imagiológicos, tais como ecografia, radiologia e endoscopia, e interpretação de exames laboratoriais sanguíneos, bioquímicos, sorológicos (para pesquisa de hemoparasitas e como parte integrante de exames de exportação) e citológicos. Foi-me atribuída responsabilidade crescente na realização das funções médico-veterinárias, permitindo a aquisição de aptidões essenciais à prática profissional, principalmente na área da cirurgia onde intervim activamente como circulante e na monitorização da anestesia. É de destacar também o contacto que tive com proprietários e responsáveis pelos equinos, onde aprendi com o orientador a dialogar de forma profissional e ética com o cliente, e também a assumir uma postura correcta perante o mesmo em diversas situações.

Tive inclusivamente a oportunidade de participar em acções de formação realizadas entre membros da *Hippiatrica*, onde realizei apresentações sobre o diagnóstico da Osteocondrite dissecante (OCD) e bloqueios intra-articulares da região társica. O Dr. Manuel Torrealba ofereceu extensas lições sobre a utilização da técnica ecográfica e radiológica na região distal dos membros e sua posterior interpretação, assim como demonstrações detalhadas das intervenções cirúrgicas comumente realizadas nessa zona, tais como a desmotomia do ligamento anular, a tenoscopia da bainha tendinosa digital e a nevrectomia do nervo digital palmar.

Como o orientador tem um especial interesse em medicina desportiva, isso reflectiu-se na casuística cirúrgica observada na *Hippiatrica* e exposta no Gráfico 1. Verifica-se que 58% das cirurgias efectuadas são do foro músculo-esquelético, com predominância do *splitting* e das administrações intralesionais de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) efectuadas em todos os casos de tendinites e desmites observados (Tabela 1). As intervenções clínicas observadas também se concentraram principalmente no sistema músculo-esquelético, seguindo-se o tratamento de lesões traumáticas da pele (feridas). Todas as cirurgias presenciadas estão referidas no Anexo 1 sob a forma de tabela.

Gráfico 1 - Distribuição do número de cirurgias acompanhadas por tipo



Logo no início do meu estágio deparei-me com a redução cirúrgica de uma fractura da segunda falange do membro posterior esquerdo (MPE) (Figura 1), onde se optou pela artrodese cirúrgica. Tive oportunidade de observar toda a evolução pós-cirúrgica deste animal e de realizar procedimentos fisioterapêuticos diários com vista à sua recuperação. Foi o primeiro caso de internamento que me colocou ao corrente do nível de responsabilidade necessário, talvez pelos procedimentos já referidos, mas também por ter sido o mais complicado em termos de manejo, uma vez que a vigilância teve que ser constante devido ao risco de ocorrência de laminite no membro posterior contralateral.

Tabela 1 - Cirurgias do sistema músculo-esquelético observadas

Redução de fractura	1
Redução de fractura e artrodese cirúrgica	1
Excisão de exostose	2
Artroscopia	3
Tenoscopia	1
<i>Splitting</i> e PRP	5
PRP (em estação)	1
Total	14

A cirurgia de equinos envolve mais riscos para o animal e para o médico veterinário (mv) do que a cirurgia de pequenos animais, especialmente devido à diferença de tamanhos, resultando num acréscimo de problemas que podem advir intra e pós-cirurgicamente. As complicações pós-cirúrgicas acompanhadas durante o estágio foram a rabdomiólise, a paralisia do nervo radial devido ao decúbito lateral durante a cirurgia e recobro, e o hematoma da veia jugular no local da cateterização. A complicação mais específica

Figura 1 - Equino após redução de fractura da 2ª falange do membro posterior esquerdo



observada ocorreu durante o recobro de uma cirurgia de redução de uma fractura cominutiva do terceiro metacarpiano, onde sucedeu a luxação da articulação carpo-metacárpica.

O meu interesse pela terapia regenerativa com PRP surgiu antes de frequentar o estágio curricular, quando tive a oportunidade de frequentar um estágio observacional no Hospital de Equinos do Centro Militar de Educação Física e Desportos (CMEFD). Foi o interesse do Dr. João Borges em métodos terapêuticos regenerativos que suscitou a minha curiosidade sobre o tema. Mas foi na clínica *Hippiatrica* que fiquei ao corrente de todos os aspectos desta terapia, tendo parte activa em todos os passos para a sua obtenção e administração. A meu ver, a terapia com PRP é uma terapia com inúmeras potencialidades mas que ainda não se estabeleceu na clínica corrente em Portugal porque é desconhecida e também desacreditada por vários mv.

O PRP corresponde a uma pequena fracção de plasma com uma concentração de plaquetas superior à fisiológica, resultante do processamento do sangue total autólogo. A utilização desta terapia nas lesões tendinosas e ligamentosas em Medicina Veterinária (MV) iniciou-se há menos de uma década, mas depressa evoluiu devido a todas as suas qualidades, principalmente a regenerativa. Este trabalho centrou-se no enquadramento desta recente terapia na resolução de lesões a nível de tendões e ligamentos, dando ênfase a todos os aspectos que envolvem estas estruturas, tais como a sua composição, o modo como reagem às lesões e a etiologia destas, para que sejam compreendidos os princípios básicos de actuação dos componentes do PRP, ou seja, dos factores de crescimento (FC). Seguidamente serão abordados todos os aspectos relacionados com PRP, incluindo todos os princípios biológicos que servem de apoio à sua utilização nas lesões músculo-esqueléticas. Como nestas lesões nenhuma terapia é eficaz quando aplicada isoladamente, será também abordado um dos princípios mais importantes na recuperação de um animal com lesões tendinosas ou ligamentosas, a reabilitação. É ainda discutido o método de eleição para diagnosticar e acompanhar as referidas lesões.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Caracterização funcional, estrutural, fisiológica e bioquímica dos tendões e ligamentos

1.1. Função anatômica

A estrutura anatômica dos equinos evoluiu desde há milhões de anos no sentido de maximizar a sua eficiência locomotora. Esta evolução reflectiu-se em determinadas particularidades anatômicas e funcionais a nível dos tendões e ligamentos que, por sua vez, se tornaram especializados na absorção de energia de impacto e no suporte do peso corporal durante a propulsão do animal.

Os tendões e os ligamentos são bandas de tecido conjuntivo que, embora macro e microscopicamente semelhantes, desempenham funções distintas. Como resultado, estas duas estruturas são diferenciadas a nível organizacional, celular, bioquímico e molecular (Lin, Cardenas & Soslowsky, 2004; Dahlgren, 2007).

A função dos tendões é transferir passivamente as forças ténseis geradas pela contracção do músculo correspondente até à articulação ou osso onde se inserem, para gerar movimento (Smith, 2011). Quando sujeitos a cargas maiores, os tendões podem também prevenir a movimentação articular além das barreiras anatômicas (Lin et al., 2004; Wang, 2006). Os tendões flexores digitais exibem uma elevada força mecânica, uma boa flexibilidade e um nível de elasticidade ideal para o armazenamento e libertação da energia potencial elástica essencial aos andamentos mais rápidos, como o galope (Dowling & Dart, 2005; Sharma & Maffulli, 2005).

Os ligamentos têm como função alinhar e estabilizar os ossos e articulações adjacentes, e providenciar resistência passiva ao movimento suportando forças de várias direcções, consoante a amplitude de movimentos da articulação que estabilizam (Dahlgren, 2007).

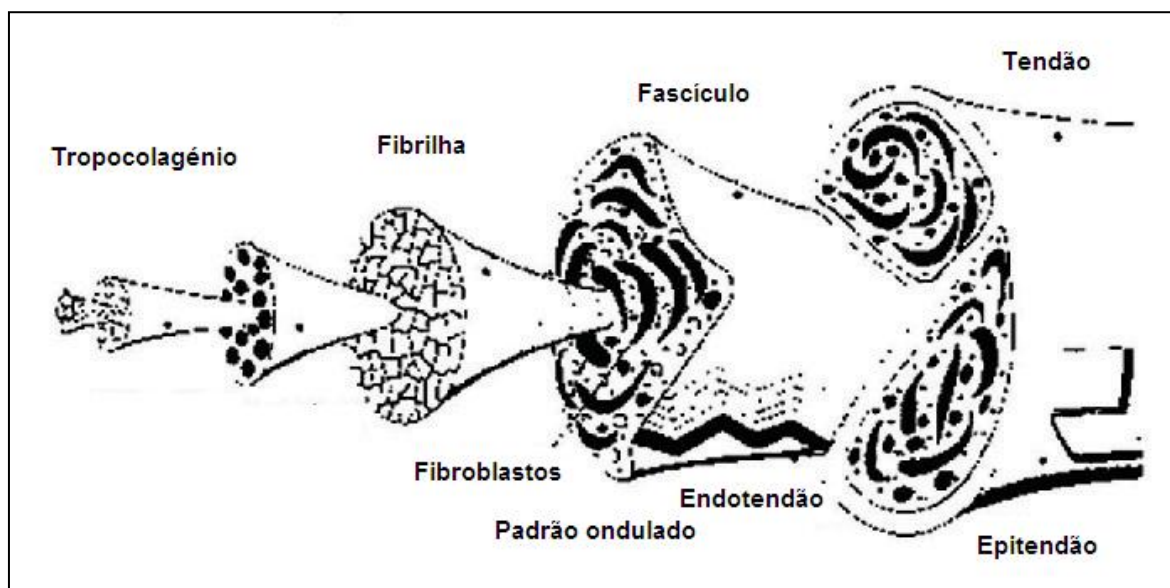
Os tendões flexores digitais e o ligamento suspensor do boleto (LSB) dos equinos, além das referidas funções, suportam grandes tensões devido à hiper-extensão das articulações metacarpo e metatarsofalângicas durante a movimentação normal do animal (Smith, 2011).

1.2. Estrutura anatômica e histológica

Os tendões e os ligamentos apresentam-se macroscopicamente como bandas fibroelásticas de cor branca brilhante. Quando são transversalmente seccionados denota-se na sua superfície uma divisão em fascículos (Smith & Goodship, 2004). Ambas as estruturas são compostas por tecido conjuntivo denso modulado possuindo uma matriz extracelular (MEC) rica em colagénio, cuja organização reflecte os requisitos mecânicos deste tecido (McIlwraith, 2002).

Os tendões consistem num agrupamento crescente de fibras de colagénio, a unidade básica da estrutura tendinosa, primordialmente compostas por fibrilhas de colagénio tipo I em percurso helicoidal, paralelamente dispostas ao longo das linhas de tensão do tendão e embebidas numa MEC de proteoglicanos, glicoproteínas, fibras elásticas, iões e água (McIlwraith, 2002; Sharma & Maffulli, 2005). A organização crescente inicia-se com ligação de cinco moléculas de tropocolagénio, que é uma cadeia polipeptídica de tripla hélice (Sharma & Maffulli, 2005), para dar início à fibrillogénese que, de um modo resumido, não é mais do que a formação de fibrilhas de colagénio funcionais (Zhang et al., 2005). Como se pode observar na Figura 2, estas fibrilhas agrupam-se consecutivamente em fibras primárias, depois em fascículos tendinosos ou fibras secundárias, em fibras terciárias, e por fim, no tendão (McIlwraith, 2002; Sharma & Maffulli, 2005; Wang, 2006).

Figura 2 – Estrutura básica do tendão



Adaptado de Sharma e Maffulli, 2005

Os fibroblastos tendinosos são fusiformes e encontram-se organizados em fileiras longitudinais por entre as fibras de colagénio. Os fibroblastos e os fibrócitos são as células responsáveis pela formação e manutenção da MEC, mas por se localizarem no tendão/ligamento são denominados de tenoblastos e tenócitos, respectivamente (Smith, 2011; Smith & Goodship, 2004).

1.2.1. Componentes da matriz extracelular

A MEC de tendões e ligamentos é constituída por dois grandes componentes: a substância fundamental e os componentes fibrilares. Os componentes fibrilares em questão são o colagénio e a elastina, em que esta última, essencial para a funcionalidade destes tecidos, constitui apenas 1 a 2% da matéria seca da MEC (Wang, 2006; Dahlgren, 2007). O colagénio é o principal constituinte da MEC de tecidos que suportam todo o género de forças, tal como os tendões e ligamentos, sendo vital para a sua resistência. Por essa razão,

80% da matéria seca da MEC de tendões e ligamentos consiste em colagénio. Nos tendões cerca de 95% do colagénio é do tipo I (Smith, 2011), enquanto nos ligamentos este apenas constitui 85% do colagénio total (Dahlgren, 2007). O colagénio tipo II está mais relacionado com a cartilagem articular, concentrando-se nos tendões e ligamentos ao nível das inserções e nos locais onde estes possuem características fibrocartilaginosas, ou seja, onde percorrem proeminências ósseas (Smith, 2011). O colagénio tipo III encontra-se principalmente no endotendão, mas a sua concentração no tecido tendinoso aumenta com o decorrer da idade (Smith, 2011). Alterações na disposição da quantidade e tipo de colagénio vão afectar directamente as propriedades mecânicas destas estruturas (Dahlgren, 2007).

A substância fundamental é um gel amorfo que tem como base complexos glicoproteicos hidrofílicos, nomeadamente proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs), várias glicoproteínas, e água (65 a 70%). Os proteoglicanos são moléculas altamente hidrofílicas que participam na interacção célula-a-célula e célula-matriz, na fibrilogénese do colagénio, no controlo do diâmetro das fibrilhas de colagénio e na homeostase geral da MEC, compondo cerca de 5% da matéria seca de tendões e ligamentos (Dahlgren, 2007). Existem dois géneros de proteoglicanos, os de grande dimensão como os agrecanos e versicanos, e os de pequena dimensão como a decorina, o biglicano e a fibromodulina. Os grandes proteoglicanos possuem numerosas cadeias laterais de glicosaminoglicanos polisulfatados (GAGPS) que, sendo altamente hidrofílicos, estão presentes onde o tendão resiste a maior compressão mecânica (Smith & Goodship, 2004; Wang, 2006; Cissell, 2009). A regulação do conteúdo aquoso pelas moléculas de GAGPS nos tendões e ligamentos confere-lhes lubrificação e espaçamento entre fibrilhas, assim como alguma flexibilidade (Cissell, 2009). Pensa-se que os pequenos proteoglicanos, principalmente a decorina (Cissell, 2009), se encontrem associados às fibrilhas de colagénio para regular o seu diâmetro (Smith & Goodship, 2004). As glicoproteínas adesivas (fibronectina e trombospondina) também compõem a matriz, participando nos processos de reparação e regeneração dos tecidos músculo-esqueléticos (Sharma & Maffulli, 2005).

A proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP) é uma glicoproteína pentamérica não colagénica encontrada em abundância nos tecidos que resistem a grandes cargas, tais como os tendões, ligamentos, cartilagem, discos intervertebrais e meniscos. Esta molécula possui funções organizacionais na formação de matrizes colagénicas, auxiliando a conexão interfibrilar de moléculas de colagénio tipo I, II e IX, e promovendo a fibrilogénese tendinosa (Smith & Goodship, 2004; Schnabel et al., 2007; Smith, 2011). Existe um aumento na produção de COMP dependente da idade, sendo que os tenócitos flexores imaturos sintetizam mais COMP que os maduros, sugerindo um envolvimento importante desta molécula no crescimento e na reparação tendinosa (Smith et al., 2006; Schnabel et al., 2007; Smith, 2011). Existe correlação entre um nível elevado de síntese de COMP durante a maturação tendinosa e a formação de uma MEC resistente e de alta qualidade, com grande

impacto na força total do tendão. Esta conclusão adveio da correlação estabelecida entre a extrema deformação tênsil do tendão flexor digital superficial (TFDS) e a concentração de COMP presente na sua MEC (Smith et al., 2006; Smith, 2011). Esta proteína compõe cerca de 3% da matéria seca do TFDS na região metacárpica (Smith, 2011). Embora sejam encontrados níveis elevados desta glicoproteína no tecido tendinoso equino normal, no tecido fibroso cicatricial é quase inexistente, podendo ser futuramente utilizada como marcador da correcta remodelação da matriz tendinosa (Smith et al., 2006).

São as exigências biomecânicas dos diferentes tendões e ligamentos que determinam a composição e organização da MEC (Dowling & Dart, 2005). Por esse motivo existem algumas diferenças entre a MEC de tendões e de ligamentos. Os ligamentos possuem uma quantidade ligeiramente menor de colagénio total, uma maior taxa de colagénio tipo III e maior concentração de GAGs em relação aos tendões. Estruturalmente, as fibras de colagénio tendinosas encontram-se alinhadas paralelamente enquanto as fibras ligamentosas se encontram menos organizadas devido às tensões multiaxiais a que estão sujeitas, possuindo mais ligações cruzadas e menos maduras que os tendões (Dahlgren, 2007).

1.2.2. Componentes celulares

Os tenoblastos e os tenócitos são as células fibroblásticas responsáveis pela síntese e manutenção da MEC. Estas células constituem entre 90 a 95% do total de elementos celulares dos tendões. Os restantes 5 a 10% correspondem a condrócitos na zona de conexão óssea e de inserção, a células sinoviais da bainha tendinosa, e a células vasculares (endotélio e musculatura lisa) (Sharma & Maffulli, 2005). Como já foi referido, os tenócitos encontram-se dispostos em fileiras longitudinais entre as fibrilhas de colagénio, dentro dos fascículos, não possuindo contacto directo com a rede vascular do endotendão. No entanto, os tenócitos emanam por entre as fibrilhas de colagénio extensões citoplasmáticas que, através de junções *gap*, formam uma rede de comunicação tridimensional complexa para facilitar a transferência de nutrientes entre as células (Smith & Goodship, 2004; Wang, 2006; Kane & Firth, 2009; Smith, 2011). Estas junções *gap* intercelulares providenciam um sistema ideal para coordenar reacções da população celular aos estímulos mecânicos (Smith, 2011), ou seja, permitem a mecanotransdução celular. A mecanotransdução é o mecanismo através do qual os tenócitos convertem um estímulo mecânico num sinal bioquímico, permitindo a adaptação do tecido a alterações fisiológicas e patológicas (Wang, 2006).

Embora todas as células fibroblásticas de tendões e ligamentos sejam colectivamente denominadas de tenócitos, não constituem uma população celular uniforme uma vez que apresentam diferente morfologia nuclear e citoplasmática. Smith (2011), e Smith e Goodship (2004) baseiam-se na forma do núcleo para evidenciar a existência de três populações de

tenócitos diferentes. Os tenócitos do tipo I têm um núcleo fusiforme, os do tipo II possuem núcleo em forma de bastonete, e os tenócitos tipo III são células tipo cartilágneo com núcleos redondos e nucléolos visíveis (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). Destes tenócitos, são os do tipo II e III que possuem maior actividade metabólica (Dowling, Dart, Hodgson & Smith, 2000). A proporção destas células varia entre tendões e ligamentos, entre diferentes locais do tendão, e com a idade (Dowling et al., 2000; Dowling & Dart, 2005; Smith, 2011). Nos equinos jovens, os tendões contêm principalmente tenócitos tipo II, enquanto nos tendões de equinos adultos predominam as células tipo I, coexistindo com células tipo III em locais sujeitos a forças compressivas. Os ligamentos contêm maior quantidade de células que os tendões, com a predominância das células tipo II (Smith, 2011).

Os tendões e os ligamentos são estruturas dinâmicas que se adaptam aos estímulos mecânicos, encontrando-se em constante renovação. Em situações fisiológicas os tenócitos mantêm o equilíbrio homeostático entre a destruição e a síntese de MEC. Este equilíbrio é mantido através de dois grupos de proteínas matriciais: as metaloproteinases e os inibidores tecidulares das metaloproteinases (TIMPs). As metaloproteinases são enzimas proteolíticas que degradam a MEC, sendo necessárias para a manutenção e reparação tecidular, e cuja actividade é em parte controlada pelos TIMPs (Dahlgren, 2007).

1.3. Estruturas associadas

Ao longo do seu percurso, os tendões deslizam sobre ossos e articulações de grande mobilidade, locais onde estão mais sujeitos a grandes forças compressivas e de tracção, e onde se encontram recobertos por canais e bainhas (Smith & Goodship, 2004; Sharma & Maffulli, 2005). Estas bainhas auxiliam a direccionar os tendões, propiciam uma superfície uniforme para o seu deslizamento e, principalmente, protegem-nos ao limitar a quantidade de fricção que estes têm que superar através da produção de fluído sinovial para uma lubrificação eficiente (McIlwraith, 2002; Sharma & Maffulli, 2005). As bainhas tendinosas são compostas por duas camadas, uma fibrosa externa e uma sinovial interna. A camada sinovial é onde se produz o fluído sinovial, encontrando-se fixa em redor do tendão onde forma o folheto parietal e o visceral, ambos contíguos através de uma prega denominada mesotendão. A presença do mesotendão não é constante em todas as bainhas sinoviais tendinosas (McIlwraith, 2002).

A zona do tendão não coberta pela bainha encontra-se envolvida pelo paratendão, um tecido conjuntivo laxo composto por fibrilhas de colagénio tipo I e III, algumas fibras elásticas e um folheto interno revestido de células sinoviais (Sharma & Maffulli, 2005). O paratendão separa o tendão do tecido envolvente permitindo a sua livre movimentação (Lin et al., 2004; Wang, 2006). O epitendão é uma bainha fina de tecido conjuntivo laxo que cobre todo o tendão, e que se encontra sob o paratendão (Sharma & Maffulli, 2005; Wang, 2006). Esta

estrutura é responsável pelo suprimento sanguíneo, nervoso e linfático intrínseco do tendão, estendendo-se por entre os seus fascículos para dar origem ao endotendão, uma rede de tecido conjuntivo reticular que reveste cada fibra tendinosa (Sharma & Maffulli, 2005).

1.4. Irrigação sanguínea

Os tendões e ligamentos em desenvolvimento são altamente vascularizados, possuindo amplas redes capilares necessárias ao elevado metabolismo que caracteriza esta fase dos tecidos (McIlwraith, 2002). No entanto, os tendões e ligamentos maduros são muito pouco vascularizados. Em termos comparativos, a circulação sanguínea do tendão equivale apenas a um terço da circulação que ocorre nos músculos (Kajikawa et al., 2008). Os tendões são nutridos de dois modos: por perfusão sanguínea, a partir da sua rede vascular intrínseca e extrínseca; e por difusão de nutrientes provenientes da sinóvia que reveste as bainhas sinoviais (Smith, 2011).

A irrigação sanguínea do tendão advém de três áreas distintas: da junção músculo-tendinosa; da junção osteo-tendinosa; e da rede vascular proveniente do paratendão e mesotendão (Sharma & Maffulli, 2005; Smith, 2011). Na zona da junção músculo-tendinosa, a rede vascular perimisial emana ramificações por entre os fascículos do tendão que apenas se prolongam até ao terço proximal da estrutura. O suprimento sanguíneo proveniente da junção osteo-tendinosa também é escasso e está limitado à zona de inserção do tendão (Sharma & Maffulli, 2005).

Os grandes vasos encontram-se geralmente dispostos longitudinalmente ao paratendão, formando anastomoses com a sua rede vascular ao longo de todo o seu percurso (McIlwraith, 2002; Smith, 2011). A perfusão extratendinosa realiza-se através das ramificações dessas anastomoses que, por sua vez, penetram no endotendão para nutrir os fascículos tendinosos (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). Como a rede vascular intrínseca de todo o tendão se concentra principalmente a nível da rede capilar do endotendão, é provável que este seja a fonte de fibroblastos (Dahlgren, Mohammed & Nixon, 2005) e células estaminais mesenquimatosas (MSCs) responsáveis pelos mecanismos de reparação intrínsecos do tendão (Smith, 2011).

Nos tendões que possuem bainha tendinosa, as ramificações de grandes vasos extratendinosos passam através do mesotendão de forma a atingir o folheto visceral da bainha sinovial, onde vão formar um plexo que nutre a superfície do tendão. Entretanto, alguns dos vasos do mesotendão penetram no epitendão que, por sua vez, estabelece ligação com os septos do endotendão que vão nutrir a parte fascicular interna da estrutura. A vascularização do tendão está comprometida nas zonas onde este é alvo de elevadas forças de torção, fricção e compressão (Sharma & Maffulli, 2005). Como existe grande dificuldade de afluência de sangue a estas zonas do tendão, a sua nutrição permanece mais

dependente da difusão a partir do fluido sinovial que da perfusão vascular (Sharma & Maffulli, 2005; Smith, 2011).

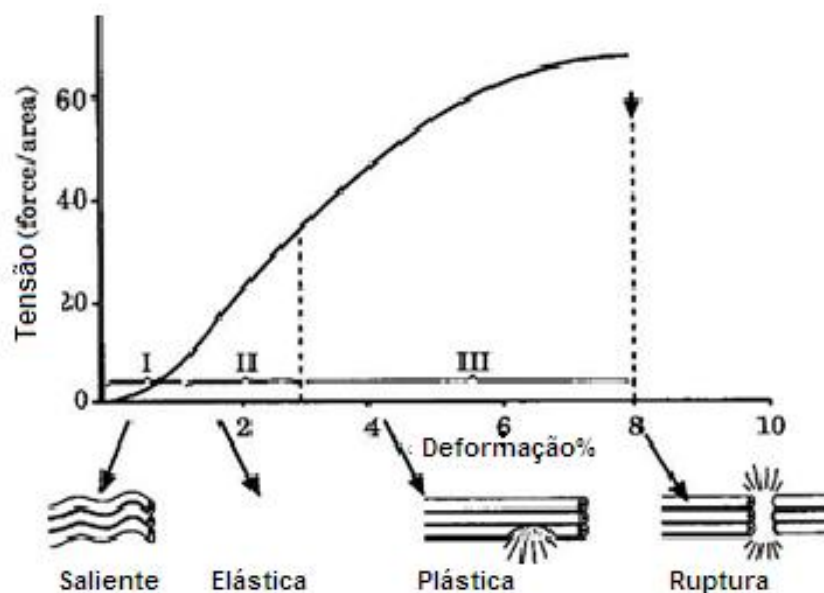
A circulação sanguínea é imprescindível para a regeneração do tecido conjuntivo (Kajikawa et al., 2008). Por isso, após a ocorrência de uma lesão o tendão sofre um processo profuso de neovascularização (McIlwraith, 2002; Dahlgren, 2007). No caso de ruptura do tendão, formam-se adesões altamente vascularizadas entre o paratendão e o tecido conjuntivo tendinoso adjacente, assegurando o fluxo sanguíneo ao tecido lesionado (McIlwraith, 2002; Kane & Firth, 2009).

1.5. Biomecânica dos tendões e ligamentos

Os tendões são diferentes entre si ao nível da sua composição e das suas propriedades materiais, reflexo das suas diferentes exigências funcionais. Quando os tendões flexores digitais suportam o peso do animal contra a superfície flexora da articulação metacarpofalângica em hiperextensão, gera-se uma grande compressão nos mesmos. Nesse local existe grande acumulação de proteínas de matriz (COMP, GAGs) que conferem propriedades fibrocartilágneas aos tendões com vista a aumentar a sua resistência. Quando se comparam os tendões flexores, que suportam cargas provindas da sustentação do peso do animal, com os tendões extensores digitais, que são tendões com funções posicionais, os primeiros são muito mais rígidos devido ao maior grau de hidratação e menor concentração de colagénio (Smith & Goodship, 2004).

Os tendões possuem geralmente uma grande resistência à tensão e uma diminuta elasticidade (McIlwraith, 2002). A rigidez dos tendões é dependente da taxa deformativa imposta (Dowling & Dart, 2005), ou seja, numa primeira fase da tensão uniaxial exercida sobre o tendão, este acomoda-se facilmente mas se a extensão do mesmo continuar, a sua resposta à força será cada vez mais rígida (McIlwraith, 2002). Esta transição corresponde ao desaparecimento do padrão ondulado da superfície tendinosa, ocorrendo aproximadamente quando o tendão é sujeito a uma distensão correspondente a 2% ou 3% do seu comprimento (Smith & Goodship, 2004; Dowling & Dart, 2005). Quando é removida a força o padrão retorna (McIlwraith, 2002). Depois de ultrapassar o limite da sua capacidade elástica, o tendão assume propriedades viscoelásticas, sofrendo alterações estruturais irreversíveis a nível da substância fundamental da MEC (McIlwraith, 2002). Existe também uma diminuição do padrão ondulado das fibras de colagénio com o aumento da idade do animal, principalmente a nível das fibras centrais. Durante o alongamento do tendão as fibras centrais são as primeiras a sofrer extensão ao receber uma carga superior à recebida pelas fibras periféricas, sendo as primeiras a rupturar quando ocorre uma sobre tensão (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). Logo, o desaparecimento do padrão ondulado de um modo diferenciado é um factor contributivo para a ocorrência das lesões centrais (*“core lesions”*) nos tendões equinos (Smith, 2011).

Gráfico 2 - Curva tensão-deformação



Adaptado de Sharma e Maffulli, 2005

A curva tensão-deformação (Gráfico 2) possui quatro fases distintas:

-“Fase saliente” - é a fase inicial de acomodação (McIlwraith, 2002), quando o comportamento biomecânico do tendão não é linear; está associada à eliminação por distensão do padrão ondulado das fibrilhas de colagénio quando são aplicadas forças de baixo nível (Smith & Goodship, 2004).

-“Fase elástica” ou “Fase de deformação linear” – caracteriza a elasticidade do tendão, porque quanto mais rígida é a estrutura mais curta será esta fase (Smith, 2011); a actividade fisiológica normal do tendão ocorre sobretudo nesta fase (McIlwraith, 2002); a distensão provém do alongamento das fibrilhas de colagénio e/ou do deslizamento entre as mesmas (Smith & Goodship, 2004).

-“Fase plástica” ou “Fase de deformação plástica” – ocorre quando se excede o limite elástico do tecido; o tendão torna-se permanentemente deformado, talvez devido a interrupção das ligações cruzadas covalentes e deslizamento das fibrilhas de colagénio (Smith, 2011).

-“Fase de ruptura” – a curva de stress-tensão desce rapidamente para zero devido à ruptura sequencial das fibrilhas de colagénio; a ruptura total do tecido pode ocorrer devido a um único evento ou em virtude de sobrecargas repetitivas, somando-se rupturas com o aumento consecutivo da carga (Smith, 2011).

Na generalidade das raças equinas, a distensão normal dos tendões flexores digitais é de 2 a 4% do seu comprimento a passo, 4 a 6% a trote, e 10 a 12% nos galopes mais rápidos, sendo armazenada mais energia elástica quanto maior for a deformação máxima atingida

(Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). No entanto, o TFDS de cavalos Puro-Sangue Inglês, a galope, consegue uma distensão de 16% do seu comprimento ao nível do metacarpo. Já foram reportadas nestes tendões distensões acima de 20% antes de ocorrer ruptura tendinosa, reflectindo a elevada especialização do aparelho locomotor equino (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). Mas esta especialização determina uma estreita margem de segurança funcional, porque ao funcionar próximo dos seus limites fisiológicos, os tendões flexores podem sofrer adulterações permanentes das suas propriedades estruturais e mecânicas, expondo-os a um elevado risco de lesão (Dowling & Dart, 2005; Smith, 2011).

2. Fisiopatologia da lesão tendinosa e ligamentosa

As lesões tendinosas e ligamentosas são uma patologia comum em equinos de desporto e de lazer por todo o mundo, e constituem uma grande perda económica para a indústria do desporto equestre. Dahlgren (2007) refere um estudo epidemiológico de 12 anos efectuado em Hong Kong sobre lesões em cavalos Puro-Sangue Inglês de corrida, onde se evidenciou que 14% dos animais se reformaram devido a lesões tendinosas.

Para a manutenção do tecido tendinoso e ligamentoso normal é necessário equilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos, e também viabilidade das células residentes (Dahlgren, 2007). Existem vários factores e mecanismos que podem perturbar essa homeostase tal como a idade do animal, o exercício inadequado ou excessivo e o descanso inapropriado que, por sua vez, aumentam a demanda metabólica da estrutura com consequente falha produtiva de MEC e morte dos tenócitos (Smith & Goodship, 2004; Ramírez, 2006; Smith, 2011). Como resultado, forma-se um tecido enfraquecido que não responde às necessidades locomotoras do equino e que contribui para a elevada incidência e recorrência de lesões tendinosas e ligamentosas (Ramírez, 2006).

Dados epidemiológicos sobre estas lesões em equinos de elevado desempenho desportivo revelam taxas de incidência de 11 a 46%, taxas de recorrência de 43 a 93% (Dahlgren, 2007) e períodos de paragem prolongados (até 18 meses), dependendo do tendão ou ligamento afectado, da actividade desportiva desenvolvida e da intensidade de treino (Kane & Firth, 2009). A corrida a galope é a modalidade desportiva que acomete mais animais em termos de lesões tendinosas, principalmente tendinite do TFDS, seguida pela modalidade de obstáculos (Kane & Firth, 2009). A tendinite do TFDS e a desmite do LSB representam cerca de 20 a 30% das lesões músculo-esqueléticas sofridas por equinos de desporto (Goodship, 1993 citado em Dabareiner, Carter & Chaffin, 2000).

Investigações mais recentes em cavalos Puro-Sangue Inglês em competição indicaram que cerca de 43% dos animais em estudo possuíam algum grau de patologia tendinosa. O mesmo estudo epidemiológico apontou para o aumento da incidência de afecções no TFDS

com o aumento da idade dos animais (Smith & Goodship, 2004), indicando que a idade poderá ser um factor de risco determinante para este tipo de lesões.

2.1. Tipos de lesão tendinosa e ligamentosa

As lesões tendinosas e ligamentosas podem ser agudas ou crónicas, e de origem intrínseca e/ou extrínseca (Sharma & Maffulli, 2005). As lesões intrínsecas estão associadas a factores indirectos ou degenerativos e as lesões extrínsecas a danos físicos directos por laceração e contusão (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011).

As lesões intrínsecas possuem etiologia multifactorial (Lin et al., 2004). Em equinos são maioritariamente consideradas lesões por sobre utilização, resultado de sobrecargas ténseis e acumulação de microtraumas na estrutura. A lesão intrínseca do TFDS na zona metacárpica é a lesão tendinosa mais comum nestes animais (Smith, 2011).

Embora algumas lesões por sobre tensão se originem a partir de uma sobrecarga súbita superior à força elástica do tendão, a maioria das lesões tendinosas em equinos adultos advém da degenerescência progressiva e cumulativa da MEC (Smith & Goodship, 2004; Ramírez, 2006; Dahlgren, 2007; Smith, 2011).

Durante uma tensão fisiológica existe um equilíbrio entre a degeneração e a produção de MEC pelos fibroblastos locais. Quando as forças de tracção se sobrepõem à capacidade elástica da estrutura provocam pequenas lesões na MEC e, conseqüentemente, inflamação no local. À medida que estas forças de tensão excessivas se vão repetindo, a síntese de MEC torna-se cada vez mais insuficiente para compensar o ritmo de destruição causada por essas tensões. A um determinado ponto, o somatório dos danos subclínicos resultantes dessa destruição irá causar sintomatologia clínica (Dahlgren, 2007; Kane & Firth, 2009). A tendinite clínica terá início quando a acumulação das microlesões causadas pelas tensões cíclicas resultar na ruptura de um considerável número de fibrilhas de colagénio, ou quando o tendão for sujeito a uma grande força ténstil depois de fragilizado pela acumulação de microlesões (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). A extensão do dano no tendão pode variar desde as quebras das ligações cruzadas entre fibrilhas, a rupturas individuais de fibras, até ao envolvimento de todo o tendão (Smith, 2011).

Existem duas teorias sobre a etiologia da lesão intrínseca, a teoria da sobrestimulação e a teoria da subestimulação. A primeira já foi referida e associa a lesão mecânica dos tendões à acumulação de microtraumas no tecido (Dahlgren, 2007). A teoria da subestimulação mecanobiológica relaciona a estimulação de um padrão catabólico pelas células tendinosas por ausência de estimulação mecânica. Esta teoria baseia-se na ideia de que a lesão ocorre em focos de sobrecarga mecânica, resultando em ruptura fibrilar. Esta ruptura irá provocar a interrupção das junções *gap* dos tenócitos, de forma a impossibilitar a transmissão dos estímulos mecânicos entre tenócitos e entre estas células e a matriz (Dahlgren, 2007; Kane & Firth, 2009). Os tenócitos possuem capacidade de accionar uma resposta catabólica

quando um determinado nível de tensão no seu citosqueleto não é correspondido por cargas externas (Kane & Firth, 2009). Assim pode ocorrer um aumento da produção de collagenases e metaloproteínases, um aumento da apoptose celular e a diminuição da expressão de TIMPs, com consequente destruição da MEC e incapacidade tecidual em manter a taxa reparativa normal perante cargas cíclicas continuadas. Sendo assim, a aplicação alternada de tensão no tendão ou ligamento lesado ajuda a prevenir estes efeitos catabólicos. Deste modo, torna-se imperativo que os cavalos com lesões tendinosas e/ou ligamentosas sejam sujeitos a períodos de exercício controlado intercalados com longos períodos de descanso (Dahlgren, 2007).

Constituem factores de risco da tendinite e desmíte todas as situações que provoquem sobre tensões constantes ou intermitentes nas estruturas de apoio. Esses factores incluem o galope a velocidade elevada, especialmente em piso duro, o peso do cavaleiro, o nível de incoordenação do cavalo causado pela fadiga e a ferração desadequada (Dowling et al., 2000; Smith & Goodship, 2004). Existem também factores intrínsecos envolvidos na fisiopatologia das lesões tendinosas e ligamentosas, nomeadamente a hipertermia no centro da estrutura e a perfusão sanguínea insuficiente, que resultam em hipoxia tecidual e posterior libertação de radicais livres de oxigénio no tendão, durante o exercício (Dowling et al., 2000; Dahlgren, 2007; Kane & Firth, 2009; Smith, 2011). Todos estes factores, aliados a uma estreita margem de segurança biomecânica dos tendões e ligamentos, conduzem, muito provavelmente, à elevada incidência de tendinites e desmítes.

2.2. Mecanismos de degenerescência tendinosa e ligamentosa

Pensa-se que a maioria das afecções tendinosas possui carácter crónico, sendo caracterizadas por uma fraca capacidade de regeneração com a progressiva degenerescência da MEC tendinosa. A MEC degenerada apresenta desorganização fibrilar, hipocelularidade, vascularização difusa e aumento da concentração de GAGs interfibrilares (Sharma & Maffulli, 2005). A degenerescência tendinosa provoca a diminuição da força tênsil do tendão, predispondo-o à ruptura. Geralmente é uma afecção que possui carácter bilateral, acometendo um dos membros mais severamente (Smith, 2011). Embora existam várias teorias sobre a degenerescência tendinosa, ainda se desconhece o mecanismo exacto do seu desenvolvimento. Sabe-se apenas que poderá derivar de processos físicos e/ou metabólicos (Smith & Goodship, 2004; Kane & Firth, 2009).

Um dos possíveis factores predisponentes de tendinite é a falha na adaptação da estrutura ao stress mecânico causado por cargas cíclicas repetitivas (Kane & Firth, 2009; Smith, 2011). A influência destas tensões sobre a inadaptação da resposta celular e a activação de enzimas proteolíticas aumenta com o decorrer da idade. Deste modo, reconhece-se uma relação entre o aumento da idade e o risco de ocorrência de lesões tendinosas (Kane & Firth, 2009). No entanto, muitos são os estímulos que resultam na síntese, libertação e

activação de enzimas proteolíticas tecidulares (Smith, 2011). As metaloproteinases são as enzimas mais envolvidas na manutenção da MEC normal, mas também são elementos chave na patologia tendinosa e ligamentosa. As metaloproteinases 1 e 13 são responsáveis pela degradação das fibrilhas de colagénio tipo I, e a metaloproteinase tipo 3 tem como alvo os agregados da MEC (Cissell, 2009).

A MEC sofre também alterações relacionadas com a idade do animal que podem ser potencialmente aceleradas pelo elevado nível de exercício. Após a maturação do tendão ou ligamento, e com o decorrer da idade, existe redução do tamanho dos fascículos de colagénio, redução do padrão ondulado, diminuição da celularidade central, da concentração de GAGs e de COMP, e aumento na concentração de colagénio tipo III (Dowling et al., 2000; Smith, 2011). Estas alterações reflectem a progressão da degenerescência tendinosa ou ligamentosa através de uma resposta de reparação inadequada e de uma limitada capacidade de adaptação do tecido ao exercício (Dowling et al., 2000; Dowling & Dart, 2005; Smith, 2011). Uma falha na adaptação dos tecidos a tensões excessivas e/ou cíclicas resulta na libertação exagerada de citocinas catabólicas tais como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) (Lin et al., 2004; Ramírez, 2006). Posteriormente, existe promoção da modulação da actividade celular com consequente regulação positiva de metaloproteinases matriciais, leucotrienos, prostaglandina E₂ (Cissel, 2009) e radicais livres, e com regulação negativa dos TIMPs. Todos estes fenómenos celulares e moleculares resultam na inflamação do tecido e na degradação continuada da MEC, conduzindo desta forma à patologia tendinosa crónica (Sharma & Maffulli, 2005; Ramírez, 2006; Smith, 2011). Todos os processos catabólicos que originam lesões músculo-esqueléticas crónicas em equinos são responsáveis pela apoptose das células residentes e, simultaneamente, não permitem o recrutamento e diferenciação de MSCs para as repor (Ramírez, 2006), resultando no aparecimento de zonas acelulares dentro da estrutura tendinosa ou ligamentosa (Smith, 2011). Devido ao reduzido número de tenócitos, será produzida MEC de baixa qualidade que vai predispor o tecido à lesão.

Os mecanismos de alteração da composição biológica e do comportamento biomecânico do tecido tendinoso ou ligamentoso relacionados com a idade são diversos e muito complexos. Alguns desses mecanismos envolvem a diminuição dos níveis de FC em circulação e a perda da capacidade de produção de MEC pelos tenócitos (Kane & Firth, 2009) que, por sua vez, poderá dever-se tanto à ausência de estimulação por FC como à senescência celular (Smith & Goodship, 2004). A COMP é muito abundante nos tendões flexores de equinos e, como já foi referido, sofre alterações com a idade e com o nível de exercício do animal. A concentração de COMP aumenta ao longo do crescimento do tendão, atingindo o nível máximo aquando a maturidade deste tecido (2 anos de idade), ocorrendo de seguida o seu declínio (Smith & Goodship, 2004; Dowling & Dart, 2005). Dowling e Dart (2005) referem que devido à realização de exercícios de elevada intensidade a longo prazo, existe redução da

concentração de COMP na região central do TFDS. O factor de crescimento transformador beta (TGF- β) é um potente FC anabólico que estimula a síntese de COMP. Como a produção deste FC diminui ao nível dos tendões flexores digitais quando o equino atinge a maturidade esquelética, a concentração de COMP também diminui, principalmente na zona central destes tendões, na região metacárpica (Smith & Goodship, 2004). Um estudo *in vitro* demonstrou que na ausência de FC os tenoblastos em cultura sintetizam COMP muito lentamente, mas com a adição desses factores, especialmente TGF- β 1, há um aumento dramático na síntese desta glicoproteína (Smith et al., 2006). Sabe-se também que o TGF- β em conjunto com uma carga mecânica controlada aumenta a síntese proteica no tendão. No entanto, os tendões de animais adultos possuem uma resposta diminuta a ambos estes estímulos (Smith & Goodship, 2004). Kane e Firth (2009) referiram no seu trabalho que durante a maturação do TFDS ocorre redução da expressão das proteínas que compõem as junções *gap*. Sabe-se que estas junções são necessárias à síntese de MEC pelos tenócitos, ocorrendo assim uma redução na capacidade de síntese de MEC no tendão maturo (Kane & Firth, 2009). Pode então concluir-se que a falha da resposta adaptativa dos tendões adultos à elevada carga de exercício reside na sinergia entre a ausência de FC e a senescência dos tenócitos (Smith & Goodship, 2004).

A degenerescência tendinosa e ligamentosa pode ser induzida indirectamente por mecanismos associados ao exercício, tais como: a hipertermia, a hipoxia tecidular e a reperfusão após isquémia.

Durante a locomoção os tendões armazenam energia elástica, sendo 5 a 10% dessa energia posteriormente convertida sob a forma de calor. Aliando essa forma de libertação energética com o facto de a irrigação sanguínea ser insuficiente para dissipar o calor produzido, é comum serem atingidas elevadas temperaturas nos tendões flexores digitais. Os TFDSs dos cavalos Puro-Sangue Inglês podem atingir 45°C durante o galope (Kane & Firth, 2009; Smith, 2011). Mesmo que em curtos períodos as temperaturas elevadas não causem a morte dos tenócitos, os choques térmicos repetidos ou prolongados podem alterar o seu metabolismo, comprometer a sua viabilidade e causar a desnaturação de proteínas da MEC, levando à degenerescência do tendão (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011).

Geralmente, o fluxo sanguíneo dos tendões diminui com a idade e com a carga mecânica a que estão sujeitos (Sharma & Maffulli, 2005). No entanto, o exercício, em situação normal, aumenta em 200% o aporte sanguíneo aos tendões flexores digitais, e, em caso de lesão, este aporte aumenta em 300%, tanto no membro lesionado como no membro contralateral (Smith, 2011). Estes tendões atingem as maiores taxas de distensão através das grandes cargas suportadas durante os andamentos mais rápidos do equino, como o galope (Smith & Goodship, 2004; Dowling & Dart, 2005). Nestas condições de tensão máxima, as forças compressivas geradas pelo alongamento das fibras limitam, ou até impossibilitam, o fluxo sanguíneo intratendinoso, resultando em hipóxia tecidular transitória (Sharma & Maffulli,

2005; Smith, 2011). Esta hipóxia, além de resultar na falta de oxigenação dos tenócitos, é também responsável por danificar a MEC, porque, enquanto permanecer, o tecido tendinoso dependerá do metabolismo oxidativo para manter os níveis celulares de ATP. Ou seja, ocorre isquemia quando o tendão se encontra na máxima carga tênsil, e, quando se dá o relaxamento, ocorre a reperfusão tendinosa com a consequente libertação de uma quantidade considerável de radicais livres de oxigénio, que poderão danificar o tendão (Sharma & Maffulli, 2005).

2.3. Processo de reparação dos tendões e ligamentos

A cicatrização deficiente e lenta de ossos, tendões, ligamentos e outros tecidos moles constitui um problema clínico comum na prática equina. Os tendões e os ligamentos têm em média um consumo de oxigénio 7,5 vezes inferior ao músculo esquelético. Uma baixa taxa metabólica aliada a uma imensa capacidade de produção de energia anaeróbia são essenciais para sustentar tensões e cargas durante longos períodos de tempo, reduzindo o risco de isquemia e a subsequente necrose tecidual. No entanto, o metabolismo baixo resulta numa reparação retardada destes tecidos (Sharma & Maffulli, 2005).

A capacidade de reparação lesional do tendão ou ligamento depende da localização da estrutura, da extensão e severidade da lesão, da disponibilidade de tecido sinovial para difusão de nutrientes, da existência de suprimento sanguíneo e do grau de mobilidade da estrutura. Além da capacidade diferencial de reparação conferida pelas propriedades intrínsecas dos tecidos, a reparação das estruturas músculo-esqueléticas também está dependente de factores externos tais como a condição física, a alimentação e o habitat do animal (Lin et al, 2004).

Logo após a ocorrência de uma lesão no tendão ou ligamento, a síntese de colagénio tipo III aumenta de modo a formar várias ligações cruzadas irregulares, oferecendo precocemente estabilidade ao local da lesão. O tecido cicatricial assim formado é caracterizado por uma concentração muito elevada de colagénio tipo III, pela ausência de fibras primárias e pela presença de um padrão de fibras desorganizado e sem linearidade (Fortier, 2009). Estas propriedades melhoram com o tempo, mas não retornam aos níveis normais, mesmo após meses de recuperação (Lin et al, 2004; Fortier, 2009; Smith, 2011). A cicatrização lenta dos tendões e ligamentos juntamente com as propriedades estruturais, organizacionais e mecânicas inferiores do tecido reparado são responsáveis pela elevada taxa de recorrência das lesões tendinosas e ligamentosas (Fortier, 2009).

Quando as lesões atingem as bainhas do tendão ou ligamento ocorre a formação de adesões tecidulares. Deste modo facilita-se o acesso vascular aos tecidos lesionados. A ruptura da bainha sinovial aquando da lesão permite a invasão da zona de reparação por tecido de granulação e tenócitos provenientes dos tecidos envolventes, resultando na formação de aderências peritendinosas (Sharma & Maffulli, 2005; Kane & Firth, 2009). O

tecido cicatricial persiste dentro e entre os fascículos tendinosos, interferindo com a função mecânica normal destas estruturas (Kane & Firth, 2009), resultando assim na diminuição do desempenho desportivo do equino.

A reparação tendinosa e ligamentosa é um processo dinâmico onde ocorrem diferentes eventos celulares e bioquímicos. A reparação ocorre em três fases que se vão sobrepondo: inflamação, proliferação e remodelação. Todas estas fases são mediadas por inúmeros FC que actuam através de um conjunto de vias de sinalização inter-relacionadas (Wroblewski, Mejia & Wright, 2010).

2.3.1. Fase aguda (inflamatória)

Esta fase é caracterizada clinicamente por sinais inflamatórios (dor, calor, tumefacção), e histologicamente pelo influxo de células responsáveis pelos eventos necessários à progressão da reparação tecidular. A fase aguda da cicatrização começa imediatamente após a ocorrência da lesão e perdura durante uma a duas semanas, dependendo da severidade do dano e das medidas terapêuticas aplicadas após o diagnóstico (Dahlgren, 2007; Maia et al., 2009; Smith, 2011).

Primeiro ocorre extravasamento de sangue para a lesão devido à ruptura de vasos do endotendão e danos na MEC do tecido afectado, formando-se assim um hematoma (Smith & Goodship, 2004; Dahlgren, 2007). O processo hemostático inicia-se pela activação de plaquetas, da cascata de citocinas vasodilatadoras e de mediadores pro-inflamatórios. Estes componentes iniciam a reacção inflamatória através do incremento do aporte sanguíneo ao local com consequente formação de edema, infiltração de neutrófilos, macrófagos e monócitos, e secreção de enzimas proteolíticas (Smith, 2011). Os FC libertados ligam-se a componentes da MEC ainda intacta (colagénio, GAGs e proteínas adesivas) de modo a estabelecer gradientes quimiotácticos para o recrutamento celular de fibroblastos, leucócitos e células endoteliais. A MEC irá assim funcionar como reservatório de citocinas, para que estas sejam progressivamente libertadas pelas metaloproteinases matriciais (Lin et al., 2004).

As células inflamatórias atraídas ao local iniciam a fagocitose de tecido necrótico e detritos celulares, destruindo o coágulo formado inicialmente. Os macrófagos libertam factores vasoativos e quimiotácticos para o recrutamento de fibroblastos e de outras populações celulares essenciais ao processo de reparação, e para estimular o crescimento de redes capilares dentro da lesão (angiogénese) (Lin et al, 2004; Dahlgren 2007).

Durante esta fase ocorre regulação ascendente da expressão génica de FC e citocinas que direccionam o percurso da cicatrização (Wang, 2006; Dahlgren, 2007), ou seja, ocorre transcrição de um número crescente de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) necessárias à produção dessas proteínas, a partir dos genes responsáveis pela sua codificação. Numa

tentativa de estabilização da MEC neoformada, ocorre também um aumento local de ácido desoxirribonucleico (ADN), fibronectina, GAGs, água e colagénio tipo III (Lin et al., 2004). A inflamação pronunciada resulta na libertação de enzimas proteolíticas que, por um lado, vão exercer a sua função natural de remover tecido necrótico, mas por outro lado vão destruir a MEC adjacente (Kane & Firth, 2009; Smith, 2011). A resposta inflamatória é geralmente excessiva nos tendões e ligamentos provocando um aumento da área lesional poucos dias após o seu início (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). O aumento do grau de inflamação encontra-se proporcionalmente relacionado com o aumento da infiltração celular e, conseqüentemente, com a formação de uma maior quantidade de tecido de granulação (Smith, 2011). A fisioterapia torna-se assim o aspecto mais importante do manejo inicial da tendinite, tendo como objectivo minimizar a reacção inflamatória e limitar a acção das enzimas proteolíticas (Dowling et al., 2000; Smith & Goodship, 2004).

2.3.2. Fase subaguda (Proliferativa)

À medida que se vai esgotando a resposta celular inicial, vai-se iniciando a fase proliferativa da reparação da lesão. Esta fase tem início cerca de quatro dias após a lesão e é caracterizada pelos processos de angiogénese e fibroplasia, e pela formação de um tecido desorganizado que possui alinhamento inadequado das fibrilhas de colagénio (Maia et al., 2009). Cerca de uma a duas semanas depois da ocorrência da lesão, o tecido cicatricial permanece um composto gelatinoso de sangue coagulado, fibrina e MEC destruída (Dahlgren et al., 2005; Kane & Firth, 2009).

Nesta fase o endotendão hipertrofia devido à intensidade dos processos vasculares e celulares que ocorrem em torno da área lesionada (Dahlgren et al., 2005; Dahlgren, 2007). Do endotendão provêm fibroblastos e MSCs. Estas últimas são identificadas como células de grandes dimensões, ovais e indiferenciadas, que migram desde os vasos sanguíneos recém-formados até à lesão, em resposta às substâncias quimiotácticas libertadas durante a fase inflamatória (Dahlgren, 2007).

Para além do aumento gradual da celularidade na lesão devido à migração celular extrínseca (bainhas tendinosas) e intrínseca (epitendão e endotendão), também ocorre proliferação dos tenócitos locais e adjacentes (Kane & Firth, 2009). A proliferação celular é a resposta inicial à lesão. Atinge o seu máximo duas a quatro semanas após a agressão inicial e permanece elevada até às 24 semanas (Dahlgren et al., 2005; Dahlgren, 2007). Os fibroblastos envolvidos tornam-se globosos e muito activos uma a duas semanas após a lesão, porque nesse período produzem quantidades crescentes de componentes matriciais como o colagénio tipo I, o colagénio tipo III e os GAGs (Dahlgren, 2007). Nas primeiras quatro semanas, a concentração local de colagénio tipo III aumenta para 66% do colagénio total, permanecendo mais elevada que no tendão normal até às 24 semanas após a lesão (Dahlgren, 2007). As ligações interfibrilares de colagénio tipo III são necessárias durante a

fase proliferativa para atribuir estabilidade e força mecânica ao tecido cicatricial prematuro, para que este suporte pelo menos um nível de exercício mínimo (Dahlgren, 2007).

À medida que a fase proliferativa vai decorrendo, os tenócitos vão adoptando uma forma mais alongada ou fusiforme, aproximando-se da forma dos tenócitos presentes no tecido tendinoso e ligamentoso saudável (Dahlgren et al., 2005). Vai também ocorrendo a optimização da síntese de colagénio e a gradual conversão do colagénio tipo III em colagénio do tipo I. As fibrilhas fracas e finas de colagénio tipo III vão sendo substituídas por fibrilhas de colagénio tipo I, maiores e com maior força tênsil. Por volta da oitava semana após a lesão, quando o processo proliferativo termina, as fibrilhas de colagénio tipo I já constituem mais de 90% do colagénio total na zona lesionada (Dahlgren, 2007).

2.3.3. Fase crónica (remodelação)

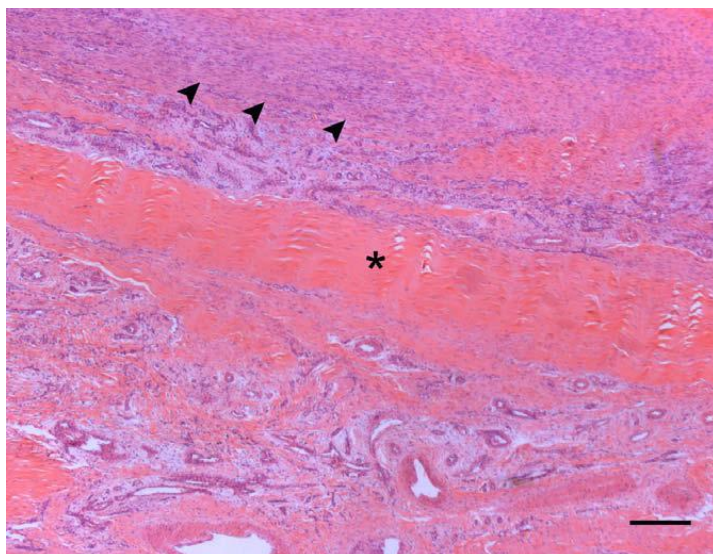
A fase de remodelação do processo de reparação de tendões e ligamentos é essencial para a capacidade de retorno do equino à actividade desportiva. Inicia-se por volta da sexta semana após a lesão e perdura durante seis a doze meses, por vezes mais. Esta fase é caracterizada pelo aumento da resistência e da força tênsil da zona lesionada do tendão ou ligamento (Dahlgren, 2007; Maia et al., 2009). Encontra-se subdividida em fase de consolidação e fase de maturação (Sharma & Maffulli, 2005). A fase de consolidação começa às seis semanas pós lesão e continua até às dez semanas. Durante este período existe mudança do tipo de tecido de reparação, passando de celular a fibroso com a síntese de uma maior proporção de colagénio tipo I. O metabolismo dos tenócitos mantém-se elevado e estes vão ficando alinhados com as linhas da tensão do tendão ou ligamento. Após a décima semana ocorre a fase de maturação, com substituição gradual do tecido fibroso cicatricial por tecido tendinoso, que perdura até mais de um ano após a lesão (Sharma & Maffulli, 2005).

A nível histológico, os fibroblastos diminuem de tamanho e o seu núcleo torna-se mais fusiforme, indicando a redução da sua actividade de síntese. Inicia-se também a orientação longitudinal das fibras de colagénio ao longo do eixo maior do tendão, com progressivo restabelecimento do padrão ondulado (Lin et al., 2004; Kane & Firth, 2009).

Quando a cicatriz entra em maturação existe um retorno notável do rácio colagénio tipo I/ tipo III (um aumento superior da produção do colagénio tipo I em relação ao aumento da produção do colagénio tipo III), um aumento das ligações cruzadas do colagénio (Dahlgren 2007; Smith, 2011), e uma maior concentração de GAGs, água e ADN (Lin et al., 2004). No entanto, uma análise histológica efectuada 24 semanas após a ocorrência da lesão tendinosa demonstra que as fibras de colagénio permanecem aleatoriamente dispostas, a celularidade permanece elevada (Dahlgren et al., 2005), a divisão fascicular é mínima, e o endotendão permanece hipertrofiado por conter um elevado número de vasos sanguíneos e

fibroblastos (Figura 3) (Kane & Firth, 2009). Pensa-se que a falha na resolução do estado de hipervascularização contribui para os sinais de dor nas lesões crônicas (Kane & Firth, 2009).

Figura 3 - Imagem histológica de uma ruptura do tendão flexor digital superficial vários meses depois da ocorrência



A imagem demonstra a persistência de um elevado número de vasos sanguíneos provindos do endotendão, tecido tendinoso com padrão ondulado de aparência normal (asterisco), e uma região extensa de tecido cicatricial persistente (setas). Corado com hematoxilina e eosina. Traço = 300µm. Adaptado de Kane e Firth, 2009.

Um tendão danificado não recupera completamente as propriedades biológicas e biomecânicas de um tendão normal. Existe dificuldade em restaurar a superfície deslizante do tendão ao mesmo tempo que se restabelece a continuidade das fibras de colagénio, porque uma cicatrização exuberante pode restringir o deslizamento do tendão e uma cicatrização deficiente pode levar a uma ruptura prematura do tecido em remodelação (Smith, 2011). Assim, nesta fase é muito importante a realização de exercícios de reabilitação para, à medida que decorre a remodelação tecidular, aumentar a resistência do tecido de granulação e evitar a formação das aderências (Smith, 2011).

O tecido tendinoso encontra-se recuperado 15 a 18 meses após o início da lesão ficando mais forte, em termos de rigidez e estabilidade, que o tecido normal (Smith, 2011). O problema reside na falta de elasticidade característica do tecido tendinoso, que provoca uma maior distensão nas zonas de tendão normal adjacentes à região cicatrizada, o que pode provocar a recorrência da lesão nesse local (Dowling & Dart, 2005; Kane & Firth, 2009; Smith, 2011).

2.4. Tratamento médico e cirúrgico convencional

A função primordial de qualquer tratamento médico e/ou cirúrgico e de qualquer indicação de manejo a aplicar nas afecções tendinosas e ligamentosas é a maximização da reparação da estrutura envolvida, para que seja produzido um tecido forte e elástico, adequado ao

retorno do equino ao seu nível de desempenho desportivo com o menor risco possível de recorrência da lesão. No entanto, o tratamento e a reabilitação de cavalos com lesão tendinosa e/ou ligamentosa são muito problemáticos tanto para o mv como para o proprietário (Dowling & Dart, 2005). Segundo Jorgensen, Genovese e Ross (2011), “a terapia instituída tem de ser multifacetada, com o objectivo de reduzir a resposta inflamatória e a hemorragia na fase aguda, e melhorar o alinhamento das fibras de colagénio durante a longa fase de reabilitação” (p.707, tradução livre).

Ainda não existe um método terapêutico universal para estas lesões na medida em que cada mv se baseia na sua experiência profissional para definir um método terapêutico. Os procedimentos médicos e cirúrgicos convencionais e correntes possuem bases pouco objectivas acerca da durabilidade e consistência dos seus efeitos, demonstrando pouco sucesso em fazer retornar os atletas equinos ao seu desempenho pré-lesão (Dowling et al., 2000). Geralmente, os tratamentos aplicados a estas lesões incluem um programa inicial de repouso, seguido de uma rotina de exercício gradualmente incrementado, medicação anti-inflamatória, colocação de ligaduras compressivas, aplicação cutânea de vesicantes, administrações intralesionais ou sistémicas com GAGPS, ácido hialurónico (AH) e fumarato de beta-aminopropionitrilo (BAPN), *splitting* do tendão ou ligamento, e mais recentemente, terapia com ondas de choque extra-corporais e terapia com laser de baixa potência.

A classificação da lesão tendinosa ou ligamentosa nas fases aguda (inflamatória), subaguda (de reparação) e crónica (de remodelação), permite a aplicação de terapias específicas baseadas nas características de cada fase. A fisioterapia faz parte do tratamento conservativo das lesões tendinosas e ligamentosas e engloba a crioterapia, o repouso na boxe e a colocação de ligaduras compressivas ou de protecção (Dowling et al., 2000; Jorgensen et al., 2011). Estes tratamentos aplicam-se principalmente durante os primeiros sete a dez dias da lesão (Jorgensen et al., 2011), ou seja, na fase aguda da tendinite ou da desmíte, quando é imperativo limitar os efeitos nefastos da inflamação intensa.

Durante a fase inflamatória são comumente utilizados anti-inflamatórios não esteróides (AINES), principalmente a fenilbutazona (4,4 mg/kg/dia, via endovenosa), administrados diariamente e de forma sistémica. Também é comum a administração sistémica de uma única dose de corticosteróides, como a dexametasona (0,04 mg/kg), nas primeiras 24 a 48 horas da lesão (Jorgensen et al., 2011). A administração intralesional de corticosteróides deve ser evitada porque pode provocar necrose e hialinização da MEC, com posterior calcificação intratendinosa e atrasos na deposição de colagénio (Dowling et al., 2000; Jorgensen et al., 2011). É comum a aplicação tópica de dimetilsulfóxido (DMSO), um potente solvente com acção anti-inflamatória, mas esta substância pode provocar o enfraquecimento do processo de reparação (Dowling et al., 2000).

Muitos mv optam por administrar substâncias coadjuvantes da reparação tendinosa e ligamentosa, entre as quais o AH, os GAGPS e o BAPN. O AH e os GAGPS são utilizados

primordialmente na fase inflamatória, porque se pensa que possuem propriedades anti-inflamatórias (Dyson, 2004; Jorgensen et al., 2011). O AH reduz a formação de aderências peritendinosas, enquanto os GAGPS inibem a activação macrofágica, reduzem a actividade das collagenases e metaloproteinases matriciais, melhoram a organização das fibrilhas e estimulam os tenócitos a produzir colagénio, GAGs e AH (Dyson, 1997; Dowling et al., 2000; Jorgensen et al., 2011). O BAPN diminui a formação de ligações cruzadas entre moléculas de colagénio nas fases mais precoces da reparação e promove o alinhamento das fibras de colagénio, quando associado a exercício controlado (Dowling et al., 2000; Jorgensen et al., 2011). O AH de elevado peso molecular é administrado na zona peritendinosa ou intralesional (Dyson, 2004; Smith & Goodship, 2004). O tratamento com PSGAG compreende sete administrações, intralesionais ou intramusculares, com cinco dias de intervalo entre elas (Dyson, 1997; Dyson, 2004).

Um dos métodos para promover a remodelação da cicatriz disfuncional durante a fase crónica é promover a sua agudização, estimulando desta forma a vascularização na zona lesional. Uma das formas de o fazer é provocar a irritação dessa zona através da aplicação de substâncias vesicantes na pele, colocando substâncias irritantes na zona peritendinosa, ou mesmo através de procedimentos muito agressivos como a técnica de pontas de fogo (Jorgensen et al., 2011). Não há evidências que suportem a penetração das substâncias vesicantes através da pele e tecido subcutâneo até às estruturas mais profundas. Estas técnicas não demonstram benefícios na reparação tendinosa ou ligamentosa, e promovem mesmo a formação de aderências peritendinosas (Dowling et al., 2000).

Caso se opte pelo tratamento cirúrgico, a técnica cirúrgica utilizada deve ser sempre integrada numa abordagem multi-objectiva à regeneração do tendão ou ligamento, dando também ênfase ao tratamento médico e ao protocolo de exercícios de reabilitação (Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011). Devido às limitações desportivas provocadas pelas tendinites e desmites, é por vezes necessário considerar a execução de técnicas cirúrgicas invasivas. Convencionalmente, na tentativa de evitar a recidiva lesional da tendinite do TFDS em cavalos de elevado desempenho desportivo, efectua-se a desmotomia do ligamento acessório associada ao *splitting* percutâneo (Dabareiner et al., 2000; Smith & Goodship, 2004). A transecção do ligamento acessório alonga a unidade músculo-tendinosa do TFDS, funcionando como uma compensação à perda de elasticidade associada ao tecido cicatricial formado no tendão, e deslocando o ponto máximo de tensão no tendão com vista à diminuição da reincidência lesional (Ross, 1997; Fortier & Smith, 2008; Ross, 2011). No entanto, alguns estudos indicam o aumento da incidência de desmite do LSB depois da desmotomia do ligamento acessório do TFDS (Ross, 1997; Smith & Goodship, 2004; Fortier & Smith, 2008).

Se ocorrer uma lesão em áreas onde os tendões e ligamentos se encontram anatomicamente confinados por estruturas circundantes (canal metacarpofalângico, canal

cárpico e região proximal do LSB), pode ocorrer a sua compressão. Nestes casos pode-se optar pela libertação dos tendões ou ligamentos através de uma intervenção cirúrgica à fáscia restritiva (Ross, 1997; Fortier & Smith, 2008). A compressão de tendões e ligamentos, assim como das estruturas neurovasculares associadas, é atribuível ao espessamento crónico destas estruturas dentro de um local estreito e não à compressão de um tendão ou ligamento normodimensionado por uma fáscia espessada (Fortier & Smith, 2008; Ross, 2011). As regiões mais comumente afectadas são o tendão flexor digital profundo (TFDP) dentro da bainha digital metacarpofalângica, a junção músculo-tendinosa do TFDS dentro do canal cárpico, e a origem do LSB dentro da fáscia circundante (Fortier & Smith, 2008). A libertação das estruturas que se encontram dentro das fásrias resulta no aumento do suprimento neurovascular e na diminuição ou cessação da compressão mecânica anormal sobre o tendão ou ligamento, aumentando assim a taxa de regeneração e diminuindo a dor vaso e neurogénica local. As técnicas cirúrgicas mencionadas são a libertação do canal cárpico por tenoscopia, a transecção do ligamento anular metacarpofalângico ou metatarsofalângico, e a fasciotomia proximal do LSB (Fortier & Smith, 2008; Ross, 2011). Quando existe ruptura total do tendão suturam-se as duas pontas para minimizar a formação de tecido de granulação, acelerar a colagenização e evitar a presença de tecido não tendinoso entre as mesmas. Ao utilizar suturas, existem alguns factores a ter em conta tais como a localização do nó, o material utilizado e o tamanho da sutura. A desvantagem da sua utilização deve-se ao facto de estas poderem interromper o suprimento sanguíneo intrínseco do tendão, e reduzir a força tênsil global do local reparado (Lin et al., 2004). Os processos de regeneração bem sucedidos para quaisquer tecidos são os que reproduzem os do desenvolvimento, onde existem interacções espaciais e temporais entre a matriz, os FC e as populações celulares (Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011). As promissoras terapias regenerativas, juntamente com um programa de reabilitação adequado e medicamente vigiado, oferecem neste momento as maiores hipóteses de sucesso terapêutico nestas lesões (Jorgensen et al., 2011).

3. PRP- Plasma Rico em Plaquetas

Desde os anos 70 que os produtos sanguíneos autólogos têm sido alvo de inúmeros estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” devido às propriedades biológicas benéficas que apresentam ao longo do processo de cicatrização (Molloy, Wang & Murrell, 2003; Smith et al., 2006; Schnabel et al., 2007; Kajikawa et al., 2008; Mishra et al., 2009; Wroblewski et al., 2010). O PRP é uma terapia regenerativa amplamente, mas insuficientemente, estudada, que nas lesões músculo-esqueléticas tem como objectivo restaurar a estrutura e a função normal dos tecidos lesionados, acelerar a cicatrização, restaurar a actividade física e evitar a

recorrência lesional (Fortier, 2011). As investigações recentes sobre os FC presentes no PRP defendem que esta terapia emergente é segura e natural (Marx, 2004; Wroblewski et al., 2010).

O PRP é composto por vários FC proteicos normalmente secretados pelas plaquetas durante a cicatrização de uma lesão. As plaquetas contêm uma concentração elevada de FC que já demonstraram melhorar a reparação tendinosa e ligamentosa em diversos modelos animais, “*in vitro*” e “*in vivo*” (Schnabel et al., 2007; Fortier & Smith, 2008; Kajikawa et al., 2008; Maia et al., 2009). O facto de ser obtida uma combinação fisiológica de FC através de um simples processo de centrifugação ou de filtração de sangue venoso faz do PRP uma terapia muito acessível e ambicionada pelo mv de equinos.

3.1. Propriedades biológicas e bioquímicas do PRP

A aplicação da terapia com PRP no processo de reparação tecidual tem em vista o melhoramento do processo biológico natural da cicatrização (Ramírez, 2006; Fortier, 2011). A agregação plaquetária é essencial à cicatrização, porque induz a libertação de FC e outros péptidos pelas plaquetas, dando início a todo o processo de reparação, e é por isso a base da terapia com PRP.

Na área de ortopedia em Medicina Humana, Wroblewski et al (2005) descreve a existência no PRP de TGF- β , factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), factor de crescimento endotelial derivado das plaquetas (PDEGF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), factor plaquetário 4, IL-1, factor angiogénico derivado das plaquetas (PDAF), osteocalcina, osteonectina, trombospondina-1, fibrinogénio, fibronectina e vitronectina. Kajikawa et al. (2008) e Schnabel et al. (2007) referiram, em estudos efectuados em ratos e cavalos, respectivamente, que o PRP contém TGF- β , factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), VEGF, IGF-1 e EGF.

A concentração dos vários FC no PRP aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração plaquetária. Os FC activados induzem vias de sinalização intercelulares que levam à quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, à angiogénese, e à formação de MEC (Ramírez, 2006; Foster, Puskas, Mandelbaum, Gerhardt & Rodeo, 2009; Wroblewski et al., 2010). As células envolvidas no processo de reparação são os osteoblastos, os fibroblastos, as células epiteliais, as células endoteliais e as MSCs. Todas estas células revelam a presença de receptores específicos para alguns dos FC plaquetários (Wroblewski et al., 2010). Para além dos seus efeitos anabólicos, os FC também regulam de forma descendente as citocinas catabólicas que participam na degradação da MEC, tais como as interleucinas e as metaloproteinases matriciais (Molloy et al., 2003; Ramirez, 2006; Schnabel et al., 2007; Wroblewski et al., 2010).

No momento da lesão as plaquetas circulantes nos capilares são activadas, libertando o conteúdo dos seus grânulos no local. Os FC libertados funcionam como componentes centrais na activação da reparação dos tecidos moles e da regeneração óssea (Wroblewski et al., 2010). Quando se aplica o PRP na lesão, o contacto das plaquetas com a membrana basal danificada dos tecidos inicia a formação de um coágulo, activando as moléculas de adesão celular existentes nesse composto, tais como a fibronectina, a fibrina e a vitronectina (Marx, 2004; Foster et al., 2009). Desta forma obtém-se uma rede que actua como uma matriz condutora que permite a ocorrência de migração celular para a lesão ao mesmo tempo que retém os FC (Fortier & Smith, 2008; Foster et al., 2009; Fortier, 2011).

Para além das propriedades de regeneração, o PRP também possui propriedades hemostáticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Segundo Wroblewski et al. (2010), a acção anti-inflamatória do PRP é demonstrada através da redução na proliferação de macrófagos e da redução na produção de interleucinas no tecido lesionado nas primeiras 72 horas após a sua aplicação.

3.1.1. A importância das plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, não possuem núcleo, têm cerca de 5 a 7 μm de comprimento e encontram-se na circulação sanguínea periférica (Ramirez, 2006). A função das plaquetas na cicatrização inicia-se com o processo complexo da hemostase, através da iniciação da cascata de coagulação. Assim, os primeiros passos do processo de cicatrização são a activação plaquetária e a formação do coágulo de fibrina. Uma vez activadas, as plaquetas sofrem modificações morfológicas, desenvolvendo pseudópodes para realizar a agregação plaquetária e posterior desgranulação para a formação do coágulo (Pietrzak & Eppley, 2005). A coagulação sanguínea ocorre dez minutos após a activação plaquetária porque são libertadas várias moléculas biologicamente activas a partir da fusão dos grânulos α , dos grânulos densos e dos grânulos lisossomais das plaquetas com a sua própria membrana plasmática (Wroblewski et al., 2010).

São os grânulos α das plaquetas que contêm os FC descritos anteriormente, TGF- β , PDGF, FGF, VEGF, IGF-1 e EGF (Ramírez, 2006; Schnabel et al., 2007; Kajikawa et al., 2008). Mais de 95% dos factores pré-sintetizados são excretados uma hora depois da activação das plaquetas (Marx, 2004; Wroblewski et al., 2010). A matriz de fibrina que compõe o coágulo sanguíneo aprisiona as plaquetas para permitir a libertação lenta da combinação natural de FC, enquanto actua simultaneamente como uma matriz provisória que facilita o acto de migração dos fibroblastos para o local da lesão. As plaquetas continuam a sintetizar e libertar FC durante todo o seu tempo de vida (5 a 10 dias), prolongando os efeitos biológicos do PRP (Marx, 2004; Wroblewski et al., 2010; Textor, Norris & Tablin, 2011).

Para determinadas formulações do PRP, como é o caso do gel, é necessária a prévia activação das plaquetas de modo a se formar o coágulo de fibrina, enquanto noutros casos

é recomendável a activação apenas *in situ*. A activação das plaquetas pode ser efectuada por agentes fisiológicos tais como a trombina, o tromboxano, o colagénio, o difosfato de adenosina, a serotonina e a epinefrina, ou por agentes farmacológicos como o ionóforo de cálcio e o cloreto de cálcio (Ramírez, 2006; Maia et al., 2009).

Quando ocorre a fusão dos grânulos α com a membrana plasmática das plaquetas, é concluída a activação biológica da maioria dos FC. É de referir que a trombospondina é a proteína mais abundante nos grânulos α e, quando é libertada, activa o TGF- β latente (Carter, Jolly, Worden, Hendren & Kane, 2003). As citocinas e os FC libertados e activos ligam-se aos receptores transmembranários de células locais e circulantes para iniciar a sinalização intracelular, que virá a afectar a expressão genética de todas as células envolvidas na cicatrização (Foster et al., 2009; Wroblewski et al., 2010). O resultado é a expressão de proteínas que regulam o processo de reparação tecidular (Foster et al., 2009). Os grânulos densos das plaquetas também são muito importantes para a cicatrização. Estes contêm aminas vasoactivas como a serotonina, a histamina e a dopamina, assim como adenosina e cálcio, cujos efeitos são fundamentais para a cicatrização, porque a actuação sinérgica destes compostos exhibe diversos efeitos nos diferentes estádios da reparação tecidular, nomeadamente através do aumento da permeabilidade vascular e da modulação da resposta inflamatória. A serotonina é uma monoamina neurotransmissora libertada no momento da lesão, com efeito vasodilatador superior ao da histamina (Wroblewski et al., 2010). A histamina e a serotonina activam os macrófagos e aumentam a permeabilidade capilar, permitindo o acesso de mais células inflamatórias à lesão (Foster et al., 2009). A adenosina é um nucleosídeo que actua como agente citoprotector reprimindo o dano tecidular. Esta molécula regula positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-18 e IL-10 pelos macrófagos imunoestimulados. O cálcio é o componente chave na reparação tecidular porque, além de ser necessário à amplificação da activação das plaquetas, numa fase posterior estimula a proliferação e diferenciação de queratinócitos, a migração epidérmica e a remodelação óssea (Wroblewski et al., 2010).

O PRP funciona então através da desgranulação dos grânulos α das plaquetas, que são o reservatório dos FC, a base da terapia. Existe uma relação proporcional entre a concentração plaquetária e os níveis de FC. Marx (2004), Pietrzak e Eppley (2005) referem que existe, *in vitro*, uma relação dose-resposta entre a concentração plaquetária e a proliferação de MSCs, de fibroblastos, e a produção de colagénio tipo I. No entanto, é difícil determinar a concentração plaquetária ideal para que o PRP tenha de facto os efeitos de regeneração desejados. Foram revistos vários trabalhos de investigação (Marx, 2004; Pietrzak & Eppley, 2005; Ramirez, 2006; Sutter, 2007; Maia et al., 2009; Wroblewski et al., 2010; McLellan & Plevin, 2011), e poucos estavam de acordo acerca da concentração ideal de plaquetas no PRP.

Marx (2004) determinou no Homem que o PRP deve conter uma concentração plaquetária pelo menos quatro vezes superior ao valor fisiológico para possuir efeitos benéficos na reparação tecidular, enquanto Sutter (2007), McLellan e Plevin (2011) referem que nos equinos são necessários valores três a cinco vezes superiores aos fisiológicos. Segundo Smith, Ross e Smith (2006), nestes animais a concentração plaquetária quatro vezes superior ao valor fisiológico varia entre 415×10^3 e 650×10^3 plaquetas/ μ l. Schnabel et al. (2007) afirmaram no seu estudo *in vitro* que uma concentração de 395×10^3 plaquetas/ μ l possui, em cultura, efeitos anabólicos na síntese de MEC no TFDS equino.

3.1.2. Factores de Crescimento

Os FC são proteínas sinalizadoras que regulam o metabolismo celular através da sua interacção com receptores membranários, com posterior activação das vias de sinalização intracelular e consequente aumento da transcrição proteica que, por sua vez, resulta numa cascata de eventos biológicos responsáveis pela reparação e regeneração tecidular (Dahlgren, 2007). Cada FC possui funções próprias (Tabela 2). No entanto, a regulação espaço-temporal dos fenómenos celulares essenciais à manutenção e reparação tecidular é complexa e requer a actuação sinérgica de vários FC (Foster et al., 2009).

Pensa-se que, no caso dos tendões e ligamentos, sejam vários os factores que contribuem para a queda da concentração de FC nos tecidos. A síntese e a distribuição de FC nos tendões flexores digitais equinos variam com a idade, observando-se níveis mais elevados nos animais mais jovens e um declínio após a maturação esquelética, resultando na diminuição da actividade dos tenócitos (Smith, 2011). Análises por reacção em cadeia da polimerase (PCR) da expressão génica de TGF- β em tendões de equinos demonstraram que esta não ocorre após o nascimento, a não ser que o tendão sofra lesão (Smith & Goodship, 2004). Carter e seus colaboradores (2003) referem que os FC na zona inferior do membro equino se encontram em concentrações insuficientes ou desequilibradas, levando ao enfraquecimento da MEC e ao retardamento da cicatrização nesta zona.

Após lesão tendinosa ou ligamentosa ocorre a regulação ascendente da expressão génica de TGF- β , PDGF, FGF, VEGF, IGF-1 e EGF. Estes FC podem ser produzidos por células intrínsecas ou extrínsecas ao tendão, ou ligamento, de modo a formar uma combinação sinérgica destas proteínas com outras moléculas sinalizadoras (Molloy et al., 2003).

Ao longo do processo de reparação vão ocorrendo alterações na expressão génica dos FC, com o intuito de originar uma libertação diferencial destes factores nas distintas fases da reparação tecidular. A expressão génica de IGF-1 aumenta com o início da cicatrização, atingindo o máximo quatro semanas após a lesão. A expressão génica de TGF- β atinge o pico uma semana após a lesão, descendo subsequentemente, mas a concentração da molécula em si só atinge o máximo às quatro semanas. A concentração de PDGF durante a

reparação tecidual encontra-se diminuída em relação à concentração existente no tendão normal (Dahlgren, 2007).

Tabela 2 - Função dos factores de crescimento (FC) durante a reparação de tendões e ligamentos

FC	Fase em que o FC é mais activo	Função
TGF-β	Inflamação Proliferação ⁽¹⁾	Regula a migração e proliferação celular
		Estimula a produção de colagénio
		Regula a expressão de proteases
		Regula o término da proliferação celular
IGF-1	Inflamação Proliferação	Promove proliferação e migração celular
		Estimula a produção de matriz
PDGF	Proliferação Remodelação	Regula a síntese proteica e de ADN no local da lesão
		Regula a expressão de outros factores de crescimento
FGF	Proliferação Remodelação	Promove a migração celular
		Promove a angiogénese
VEGF	Proliferação Remodelação	Promove a angiogénese

Legenda da Tabela 2: **TGF- β** – factor de crescimento transformador; **IGF-1** – factor de crescimento derivado da insulina tipo I; **PDGF** – factor de crescimento derivado das plaquetas; **FGF** – factor de crescimento fibroblástico; **VEGF** – factor de crescimento endotelial vascular. Adaptado de Molloy, Wang & Murrell (2003)

⁽¹⁾ - Segundo Textor, Norris & Tablin (2011)

Como forma de contornar o decréscimo endógeno de FC ao longo do percurso da cicatrização de tendões e ligamentos, poderemos recorrer à administração de FC exógenos. Deste modo, os tecidos envolvidos têm a possibilidade de se regenerar de uma forma mais natural e rápida. Os FC podem ser produzidos por bioengenharia sob a forma de proteínas recombinantes purificadas, ou adquiridos a partir de um composto natural como é o caso do aspirado de medula óssea e do PRP (Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011).

3.1.2.1. Factor de crescimento transformador beta

O TGF- β possui três isoformas, TGF- β_1 , TGF- β_2 e TGF- β_3 , encontrando-se nas plaquetas principalmente as duas primeiras (Ramírez, 2006). São proteínas com peso molecular de aproximadamente 25 quilodaltons (kDa) e são considerados os FC mais envolvidos na reparação de tecido conjuntivo e na regeneração óssea (Molloy et al., 2003).

O TGF- β é sintetizado por uma variedade de células naturalmente recrutadas para o local da lesão, como as plaquetas e os macrófagos (Marx et al., 1998; Ramírez, 2006). Este factor actua de modo parácrino, sendo que tanto os fibroblastos como as MSCs e os osteoblastos

possuem a capacidade de sintetizar e secretar TGF- β , prolongando a presença desta proteína ao longo do processo de reparação (Marx et al., 1998).

O TGF- β tem influência na iniciação e no término dos eventos proliferativos da reparação tecidual (Carter et al., 2003) através do seu funcionamento bimodal dependente da dose (Textor et al., 2011). Este factor regula a diferenciação, proliferação e quimiotaxia celular, e induz a síntese de componentes da MEC pelos fibroblastos (colagénio tipo I, fibronectina e GAGs) (Molloy et al., 2003; Ramírez, 2006; Wroblewski et al., 2010). Também regula de forma descendente a expressão das metaloproteínases, de modo a reprimir a degradação da MEC (Ramírez, 2006). O TGF- β possui ainda actividade anti-inflamatória ao modelar as acções dos macrófagos, estimulando-os a libertar citocinas e outros FC importantes para a reparação tecidual e, ao mesmo tempo, impedindo-os de libertar citocinas pró-inflamatórias e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que, por sua vez, induz a morte celular através do stress oxidativo (Carter et al., 2003).

As concentrações de TGF- β aumentam na fase mais avançada da reparação tecidual. No tendão equino a concentração de TGF- β é máxima quatro semanas após a lesão, atingindo concentrações quinze vezes superiores às presentes num tendão sã (Dahlgren, 2007; Textor et al., 2011). Textor e seus colaboradores (2011) afirmam que uma injeção de 0,5 ml de PRP pode providenciar dez a dezasseis vezes a quantidade de TGF- β que seria produzida, endogenamente, por 1 mg de tecido tendinoso lesionado. Este FC é fundamental para a cicatrização de lesões, mas é necessário que a sua expressão seja equilibrada para se formar um tecido semelhante ao normal. Quando é produzido em demasia, pode estimular a produção de tecido cicatricial hipertrófico e disfuncional (Ramírez, 2006).

Fortier & Smith (2008) relataram a utilização isolada de TGF- β na tendinite do TFDS e na desmíte do LSB. Constataram que este factor não deve ser utilizado isoladamente porque provoca uma hipertrofia palpável na zona tratada dos tendões e um aumento na taxa de ocorrência de lesão no membro contralateral (40%) (Smith & Fortier, 2008).

3.1.2.2. Factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1

O IGF-1 é um potente factor anabólico que participa no metabolismo de vários tipos celulares. Para além de ser um agente quimiotáctico de fibroblastos, estimula a síntese proteica no local e a proliferação e diferenciação de osteoblastos, promovendo a formação óssea (Wroblewski et al., 2010).

A activação plaquetária não resulta num aumento fisiológico relevante da concentração de IGF-1, porque a sua concentração nos grânulos plaquetários é inferior à que ocorre naturalmente no plasma sanguíneo (Textor et al., 2011). No entanto, sabe-se que o PRP estimula a regulação positiva da transcrição de IGF-1, sugerindo que esta terapia induz a produção intralesional endógena de IGF-1 (Textor et al., 2011). Como as concentrações de IGF-1 são diminutas durante a fase inicial da lesão tendinosa em equinos (Dahlgren, 2007),

o tratamento intralesional com esta hormona pode aumentar a celularidade e a produção de colagénio, diminuindo assim o tamanho da lesão (Textor et al., 2011). Posto isto, é esperado que o tratamento com PRP induza os mesmos efeitos.

Fortier & Smith (2008) relataram que administrações intralesionais de IGF-1 em tendinites do TFDS, induzidas experimentalmente, aceleraram o retorno do padrão normal das fibras tendinosas e melhoraram as características mecânicas do tendão. A administração intralesional de IGF-1 também já foi efectuada em contexto clínico, mas os resultados obtidos a longo prazo não foram superiores aos obtidos com a terapia conservativa utilizada isoladamente (Fortier & Smith, 2008).

3.1.2.3. Factor de crescimento derivado das plaquetas

O PDGF é uma glicoproteína mitogénica multifacetada, com peso molecular de aproximadamente 30 kDa (Marx et al., 1998), sintetizada por macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos, osteoblastos e plaquetas (Wroblewski et al., 2010). Os grânulos α das plaquetas constituem o maior reservatório de PDGF no organismo (Carter et al., 2003).

As principais actividades deste factor na reparação tecidular incluem a estimulação da angiogénese, a activação macrofágica, a quimiotaxia, a estimulação da proliferação dos fibroblastos e também a síntese de colagénio pelos mesmos (Carter et al., 2003; Molloy et al., 2003; Ramírez, 2006). Segundo Carter et al. (2003), e Textor et al. (2011), a concentração de PDGF capaz de induzir a mitose dos fibroblastos é de 2 a 5 ng/ml. No entanto, Textor et al. (2011) também referiu que, em experiências com explantes de tendão equino, se verificou que são necessários 100 nanogramas de PDGF recombinante humana por mililitro para se detectar a expressão de mRNA colagénico. Isto poderá indicar que existem respostas diferenciadas a diferentes concentrações de PDGF, ou seja, para provocar a infiltração fibroblástica na lesão bastam baixas concentrações desse factor, mas para melhorar a quantidade ou o tipo de colagénio produzido é necessária uma concentração muito superior. Também é possível que o PDGF afecte indirectamente a concentração matricial de colagénio e proteoglicanos através de mensageiros secundários, como o IGF-1 e o TGF- β (Molloy et al., 2003; Ramírez, 2006; Dahlgren, 2007).

O PDGF possui 3 isómeros: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ e $\alpha\beta$, com ligação diferencial a vários receptores celulares, por isso se pensa que actue tanto como estimulante, como supressor da reparação óssea e de tecidos moles (Wroblewski et al., 2010). A nível dérmico, o PDGF aperfeiçoa a regeneração, promovendo localmente a síntese proteica e colagénica, a migração endotelial, e induzindo ainda a expressão de TGF- β (Carter et al., 2003; Molloy et al., 2003). Também induz a mudança fenotípica dos fibroblastos para miofibroblastos, cuja capacidade contráctil é importante na contracção das feridas (Textor et al., 2011).

3.1.2.4. Factor de crescimento epidérmico

O EGF é um polipéptido de cadeia simples produzido por células epiteliais, fibroblastos e plaquetas (Ramírez, 2006). Tem grande expressão na margem de lesões cutâneas, pois aumenta a regeneração epidermal através da estimulação proliferativa de queratinócitos e fibroblastos dérmicos (Ramírez, 2006; Wroblewski et al, 2010).

Este factor estimula a expressão de genes que induzem a síntese de ADN e a proliferação celular (Wroblewski et al., 2010). A sua presença é muito importante na fase de remodelação lesional, pois aumenta a expressão de metaloproteinase 1, podendo assim regular a reposição do colagénio tipo I (Ramírez, 2006). A sua presença amplifica a concentração e os efeitos de outros FC (Wroblewski et al., 2010).

3.1.2.5. Factor plaquetário 4

O factor plaquetário 4 (PF4) é uma proteína que existe nos grânulos α das plaquetas, e que possui propriedades quimiotácticas para fibroblastos e neutrófilos, induzindo o seu influxo ao local da lesão. No entanto, a sua função biológica principal é promover a coagulação sanguínea à superfície do endotélio através da inibição da actividade da antitrombina III, pois neutraliza as moléculas heparinóides (Wroblewski et al., 2010).

3.1.2.6. Factor de crescimento endotelial vascular

O VEGF é uma proteína sinalizadora com função vasogénica e angiogénica, actuando como vasodilatador para aumentar a permeabilidade microvascular (Wroblewski et al., 2010). O VEGF, em conjunto com outros factores, estimula a migração celular e a mitogénese das células endoteliais (Molloy et al., 2003; Ramírez, 2006).

3.2. Utilização de PRP nas lesões tendinosas e ligamentosas

Devido aos mecanismos anteriormente enunciados, a magnitude da resposta de reparação dos tendões e ligamentos é geralmente inadequada à extensão da lesão. Nos casos em que a resposta à lesão é adequada, a composição e a organização final do tecido cicatricial formado não evidenciam as propriedades estruturais e biomecânicas necessárias para suportar as forças ténseis geradas durante os exercícios habitualmente executados pelos equinos (Dahlgren, 2007). O tecido reparado permanece, deste modo, susceptível a nova lesão. Há que promover a regeneração do tecido tendinoso, ou ligamentoso, porque quanto maior a semelhança estrutural, bioquímica e biomecânica do tecido reparado com o tecido normal, maior é a probabilidade do tendão suportar actividade física vigorosa (Smith & Goodship, 2004; Fortier, 2011). O PRP surge como uma “ferramenta biológica atractiva” (Fortier & Smith, 2008, p.194, tradução livre) utilizada para estimular a regeneração tendinosa e ligamentosa através da combinação fisiológica de FC.

Em medicina humana está a ser pesquisada a aplicação de PRP no tratamento de afecções músculo-esqueléticas, tais como a tendinite, a epicondilite (*tennis elbow*), a ruptura da coifa dos rotadores, a ruptura do tendão Aquiles, as lesões musculares, as lesões ósseas e a ruptura do ligamento cruzado anterior. A utilização desta terapia cresceu exponencialmente na área da medicina desportiva, porque permite aos pacientes experienciar períodos de recuperação menores, um rápido retorno ao trabalho, a formação de um tecido reparado que contribui para uma maior resistência da estrutura lesionada, e até sentir menos dor durante a recuperação (Wroblewski et al., 2010). A administração intralesional de PRP foi directamente extrapolada para a clínica de equinos neste mesmo contexto, tornando-se mundialmente generalizada apenas há cerca de cinco anos (Textor et al., 2011).

A circulação sanguínea é um factor essencial ao processo de reparação, porque dela provêm não só as plaquetas e leucócitos como também as MSCs. As MSCs conseguem-se diferenciar em linhagens celulares dos vários tecidos mesenquimatosos, tais como osso, cartilagem, tendão, músculo, entre outros, existindo não apenas na medula óssea como também na circulação sanguínea (Kajikawa et al., 2008). Segundo Kajikawa et al. (2008), uma das razões para a diminuta capacidade de regeneração dos tendões e ligamentos é o facto de ocorrer um decréscimo na concentração de células oriundas da circulação sanguínea, logo a partir da fase inflamatória do processo lesional. O PRP estimula a migração destas células para a área lesionada. A activação dessas células através dos FC existentes no PRP previne o seu decréscimo local, acelerando a reparação e promovendo a regeneração do tecido (Kajikawa et al., 2008). O efeito regenerador do PRP nas lesões tendinosas e ligamentosas depende de vários factores, entre eles a concentração de plaquetas, o volume de PRP utilizado, a extensão, o tipo e fase da lesão e a condição geral do animal (Pietrzak & Eppley, 2005). Numa lesão aguda de tecidos moles deve ser determinada a janela de tempo ideal para administrar o tratamento PRP, porque, como já se referiu anteriormente, os efeitos dos FC podem ser variados nas diferentes fases da reparação tecidular (Foster et al., 2009).

Depois da explosão inicial de FC aquando da administração de PRP, as plaquetas depositadas sintetizam e segregam factores adicionais durante a sua vida útil. Ocorrida a autólise plaquetária, as células atraídas para a lesão tendinosa ou ligamentosa, como os macrófagos e fibroblastos, assumem uma função reguladora da cicatrização através da secreção secundária de FC (Marx, 2004). Kajikawa et al. (2008) demonstraram que o PRP possui um efeito de activação bimodal sinérgico sobre os fibroblastos. Ao que parece, além do efeito quimiotáctico e proliferativo directo sobre os fibroblastos, os FC do PRP também estimulam estas células indirectamente, através da actuação dos macrófagos que chegam à lesão, oriundos da circulação sanguínea. Isto porque, uma vez presentes no local da lesão, os macrófagos são induzidos a produzir FC essenciais à activação de fibroblastos adjacentes (Kajikawa et al., 2008).

Após a ocorrência de uma lesão tendinosa ou ligamentosa, a síntese de fibras de colagénio tipo III aumenta de forma intensa, formando-se ligações cruzadas interfibrilares irregulares entre elas, para a estabilização precoce do tecido neoformado. Enquanto persiste uma concentração demasiado elevada de colagénio tipo III no tecido reparado, a síntese de colagénio tipo I vai aumentando de forma gradual (Sharma & Maffulli, 2005; Dahlgren, 2007; Fortier, 2009). Schnabel et al. (2007) indicam que a aplicação de PRP nestas lesões induz um aumento mais significativo da expressão génica de colagénio tipo I relativamente ao colagénio tipo III, aumentando assim o rácio colagénio tipo I/colagénio tipo III numa fase mais precoce do processo de reparação. Este autor também concluiu que o PRP estimula um grande número de genes que codificam moléculas matriciais (COMP) sem aumentar a expressão génica de mediadores inflamatórios, como as metaloproteinases 3 e 13 (Schnabel et al., 2007). Podemos assim dizer que o PRP contribui para a produção de um tecido reparado com composição e estrutura semelhante à do tecido normal.

Maia et al. (2009) realizaram um estudo em seis cavalos para avaliar histologicamente os efeitos do PRP no tratamento de tendinite do TFDS, induzida por collagenase. Ambos os membros anteriores foram submetidos à administração intratendinosa de collagenase no TFDS para induzir a lesão, e, doze dias depois, foi executada a administração intralesional de PRP no membro direito, com concentrações entre 320×10^3 e 500×10^3 plaquetas/ μ l. Na lesão do membro esquerdo foi aplicada solução salina a 0,9%, funcionando como controlo. Foram realizadas biópsias a todos os tendões em estudo, trinta e seis dias depois do tratamento. A análise histológica ao grupo de tendões tratados com PRP evidenciou o alongamento e um aumento da densidade dos fibroblastos, a presença de neovascularização, de infiltrados de linfócitos e plasmócitos e um nível variável de organização tecidular. Comparando com o grupo controlo, a zona lesionada dos tendões tratados com PRP demonstrou uma maior organização da MEC em relação à disposição das fibras de colagénio e dos fibroblastos, e uma redução no número e tamanho do núcleo destas células durante a fase de remodelação, sugerindo uma maior maturidade do tecido lesional (Maia et al., 2010). Maia et al. (2010) também verificaram uma diminuição na formação de aderências na superfície dos tendões no grupo tratado com PRP comparativamente aos tendões do grupo controlo, reforçando a ideia de que o tratamento com PRP promove uma reparação tendinosa mais organizada e uniforme.

Wroblewski et al. (2010) relataram um estudo retrospectivo sobre a reparação do tendão de Aquiles em humanos, em que os atletas submetidos a cirurgia e terapia com PRP recuperaram a amplitude de movimento antes dos do grupo controlo, que apenas foram submetidos a cirurgia. Os tendões reparados revelaram um aumento da força de tracção e de deformação final, atribuído aos benefícios do PRP na fibrillogénese, que, ao permitir uma estimulação mecânica precoce, conduz a uma regeneração mais rápida do tendão lesionado (Wroblewski et al., 2010). O tratamento com PRP tem um efeito positivo na fibrillogénese,

porque acelera a organização da matriz de colagénio em feixes tendinosos e o seu posterior alinhamento longitudinal ao longo das linhas de tensão (Bosch, Weeren Barneveld & Schie, 2011).

Já existem muitos relatos de casos clínicos de tendinite e desmite em equinos resolvidos com sucesso após a aplicação da terapia com PRP. Para que a descrição da literatura não se torne demasiado extensa, vão ser descritas apenas três investigações clínicas com o objectivo de retratar o panorama geral dos resultados obtidos com esta terapia.

Abellanet e Prades (2009b) realizaram um estudo clínico, em setenta e dois cavalos de desporto, sobre a administração intralesional repetida de PRP na tendinite aguda e crónica do TFDS, para avaliar os benefícios desta terapia ao nível do retorno do animal ao desempenho desportivo anterior e em termos da taxa de recorrência lesional. Os casos foram seguidos durante três anos e meio após o primeiro exame clínico. Os resultados do grupo tratado com PRP foram encorajadores: 75,7 a 79,5% dos animais voltaram ao seu desempenho desportivo, com uma taxa de recorrência de 20 a 24%, contrariamente ao grupo controlo cuja taxa foi de 43 a 93% (Abellanet & Prades, 2009b).

Júnior, Araújo, Panza e Ramos (2009) relataram três casos clínicos de desmite do LSB e dos seus ramos distais, cujo grau de gravidade lesional foi determinado através de exames ecográficos, e onde foi aplicada com sucesso uma única dose de PRP. Um dos dois casos mais severos melhorou apenas ao fim de 30 dias, enquanto o outro demonstrou melhorias ecográficas ao fim de 15 dias. No caso moderado relataram que a lesão ficou totalmente preenchida ao fim de 15 dias (Júnior et al., 2009).

Ramirez (2006) relatou a utilização de PRP em sete equinos com lesões tendinosas e ligamentosas, crónicas e agudas, sendo que quatro desses animais possuíam patologia bilateral. Este autor aplicou, em todos os casos, três administrações de PRP intervaladas de duas semanas entre si. O PRP foi preparado através do método dos tubos, um método de obtenção manual que será descrito no capítulo 3.5.2, sendo obtida uma concentração média de 250×10^3 plaquetas/ μ l. Os animais foram acompanhados durante um ano após a última administração, observando-se que seis dos animais se encontravam a trabalhar ao mesmo nível que apresentavam anteriormente à lesão, e apenas o equino com tendinite crónica do TFDS sofreu recidiva lesional três meses após o último tratamento, quando foi intensificado o programa de exercícios. Ramirez (2006) verificou, ecograficamente, que os animais com tendinite aguda do TFDS puderam reiniciar o seu trabalho 5,5 meses após o início do tratamento, ou seja, recuperaram a sua actividade em metade do tempo esperado para estas lesões, que, segundo Jorgensen et al. (2011), é de 9 a 12 meses. Estes resultados demonstram que a terapia com PRP poderá não possuir uma utilidade tão evidente nas lesões músculo-esqueléticas crónicas como apresenta nas lesões agudas.

3.3. Utilização de PRP em outros tecidos

Actualmente, em medicina humana, para além das aplicações ortopédicas do PRP, encontra-se em investigação o seu potencial de regeneração a nível dos tecidos moles. Já foram inclusivamente efectuadas investigações em modelos murinos para avaliar a capacidade terapêutica do PRP no restabelecimento da função cardíaca após enfarte do miocárdio (Mishra et al., 2009). No entanto, na clínica de equinos continua a ser necessário investigar a aplicação de PRP sobretudo nos tecidos situados na região inferior dos membros equinos, onde a reparação tecidular é considerada lenta e deficiente. Nesta secção irá ser abordada a aplicação do PRP nas lesões musculares, nas lesões articulares, nas lesões ósseas, e por fim, nas lesões cutâneas.

3.3.1. Utilização em lesões musculares

As lesões musculares podem resultar de contusões, lacerações, e mais importante, de sobre tensões. A reparação muscular ocorre de modo semelhante à tendinosa, ou seja, em três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelação; sendo também reguladas por FC e por interações intercelulares. A reposição da rede vascular local e a regeneração de ramos nervosos intramusculares integram o processo de reparação muscular, podendo ambos ser melhorados com a aplicação de PRP. Os FC que integram a terapia melhoram não só a capacidade regenerativa do músculo após lesão, mas também a própria força muscular (Wroblewski et al., 2010). Wroblewski et al. (2010) referem que a terapia com PRP foi aplicada com sucesso em atletas de elite com lesões musculares, que exibiram uma restauração funcional acelerada, retornando à função total em metade do tempo previsto. Ecograficamente, a zona reparada não evidenciava fibrose excessiva (Wroblewski et al., 2010).

3.3.2. Utilização em lesões articulares

O PRP é utilizado no preenchimento de defeitos condrais em medicina humana e veterinária, porque é uma terapia que induz a migração, proliferação e diferenciação das MSCs, promovendo, de forma segura e eficaz, a recuperação da cartilagem articular. A aplicação do PRP na matriz cartilagínea aumenta a síntese de GAGs e colagénio tipo II, ao mesmo tempo que promove o retrocesso da degradação cartilagínea. Esta terapia induz a condrogénese através da estimulação das MSCs pelos IGF-1 e TGF- β (Mishra et al., 2009), e promove a proliferação, diferenciação e adesão de condrócitos no defeito. Uma concentração de 5000 pg/ml de TGF- β induz a proliferação de condrócitos e a síntese de MEC cartilagínea *in vitro* (Carmona, Argüelles, Climent & Prades, 2007). Os FC do PRP também induzem a produção de AH, molécula que providencia um ambiente homeostático à reparação condral dentro da articulação. Assim, tal como acontece em outros tecidos

mesenquimatosos, o PRP promove a regeneração cartilágnea através da regulação das células intervenientes, da síntese proteica e de FC (Foster et al., 2009).

A Osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa das articulações e do osso adjacente, que resulta da inflamação articular. Durante a OA, a IL-1 libertada no líquido sinovial promove a regulação de metabolitos pro-inflamatórios como a prostaglandina E₂, o óxido nítrico, as metaloproteinases matriciais, entre outros. O somatório destas substâncias traduz-se na manifestação de dor e efusão articular em cavalos com doença articular. Os objectivos terapêuticos para esta doença são diminuir a inflamação, aliviar a dor, lubrificar a articulação e restaurar a homeostase articular, para retardar a progressão da doença. A administração local de PRP poderá ter efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, e até induzir a remissão dos processos degenerativos, por interferir com a acção das citocinas catabólicas (IL-1) (Carmona et al., 2007).

Em medicina humana já foram efectuados ensaios clínicos sobre a aplicação do PRP na articulação do joelho (Foster et al., 2009). Em MV, Carmona et al. (2007) verificaram o efeito clínico das injeções intra-articulares de PRP em equinos com OA, através do grau de claudicação e de efusão articular presentes. No seu estudo foram aplicadas três administrações de PRP, com duas semanas de intervalo entre aplicações. A quantidade de PRP introduzido dependeu do tipo e tamanho da articulação, e do peso de cada equino. Foi observada melhoria gradual da claudicação, principalmente entre os dois e os oito meses após a terceira injeção. A diminuição da efusão articular ocorreu durante o tratamento e até dois meses após a última injeção (Carmona et al., 2007).

Outro estudo realizado por Abellanet e Prades (2009a) em quarenta e dois cavalos de desporto com lesões de OA, englobou a administração intra-articular de PRP e o acompanhamento dos animais três anos e meio após o tratamento. Dos cavalos que receberam terapia com PRP, 70% retomaram o seu trabalho e desses animais apenas 9,5% sofreu recidiva da sintomatologia, comparativamente ao grupo controlo, onde 75% dos animais retomaram o seu trabalho, mas 33% sofreram recidiva (Abellanet & Prades, 2009a). Em ambos os estudos não foram relatados efeitos secundários, locais ou sistémicos, após a aplicação de PRP (Carmona et al., 2007; Abellanet & Prades, 2009a). O plano de tratamento proposto pelos autores para o tratamento de OA com PRP foi empírico, baseado apenas nos protocolos de manejo de artropatias inflamatórias severas em humanos. São ainda necessários estudos clínicos constituídos por um número mais representativo de casos e com grupos controlo melhor definidos, com vista a determinar os efeitos e benefícios da terapia com PRP na OA equina a longo prazo (Carmona et al., 2007).

3.3.3. Utilização em lesões ósseas

O PRP já é utilizado há cerca de vinte anos em medicina humana, na área de cirurgia oral e maxilo-facial, para acelerar a reparação do osso e dos tecidos moles adjacentes (Marx et al.,

1998). Presentemente, é utilizado sobretudo em reconstruções ósseas, electivas e traumáticas (fractura, não-união), sob a forma de um gel onde é adicionado um enxerto de osso esponjoso, ou uma matriz óssea desmineralizada, para permitir a osteocondução (Wroblewski et al., 2010).

A capacidade desta terapia em acelerar a consolidação e a reparação óssea já foi alvo de muitos estudos envolvendo falhas ósseas, realizados principalmente com modelos animais (Barbosa et al., 2008; Silva et al., 2009; Kanthan, Kavitha, Addi, Choon & Kamarul, 2011). Os PDGF, TGF- β e IGF-1 contribuem para um processo angiogénico mais acelerado e intenso, permitindo a formação precoce de redes vasculares, com uma produção osteóide maior e em menor tempo (Barbosa et al., 2008). Estes estudos concluem que o preenchimento das falhas ósseas apenas com PRP não apresenta nenhuma vantagem relativamente ao não preenchimento das falhas, porque os FC necessitam da presença de células providas de um enxerto ósseo para manifestarem a sua acção terapêutica (Barbosa et al., 2008; Silva et al., 2009; Kanthan et al., 2011).

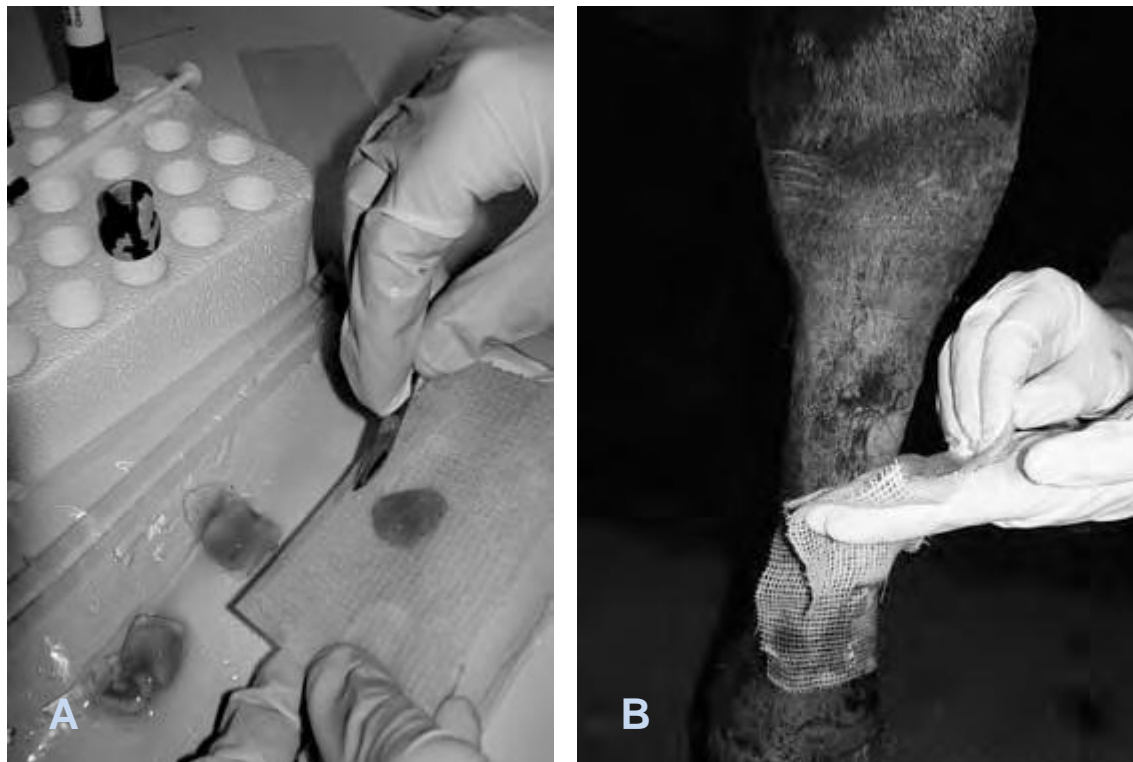
3.3.4. Utilização em lesões cutâneas

A cicatrização de lesões cutâneas nas zonas abaixo do joelho ou do curvilhão pode constituir um grande problema, mesmo em equinos saudáveis. A zona inferior dos membros encontra-se distante da circulação sanguínea central, o que dificulta a sua irrigação, resultando num menor aporte de oxigénio aos tecidos, numa menor temperatura dos membros e num desequilíbrio local de FC (Carter et al., 2003). Existem outros factores envolvidos na cronicidade das lesões cutâneas e consequente formação excessiva de tecido de granulação, tais como uma resposta inflamatória ineficaz ao trauma inicial, a persistência local de FC pro-fibróticos, uma elevada taxa de produção de colagénio e a oclusão microvascular (Monteiro, 2008).

Os tratamentos das feridas cutâneas crónicas em equinos são dispendiosos e morosos porque por vezes se limitam a ir fazendo a manutenção da lesão. Carter et al. (2003) constataram que a aplicação de gel de PRP em feridas crónicas na zona distal dos membros equinos (Figura 4) acelerou a diferenciação epitelial, promoveu a produção de uma MEC dérmica mais madura, constituída por feixes de colagénio mais organizados, e inibiu a resposta inflamatória prolongada responsável pela formação de tecido de granulação em excesso. Monteiro (2008) relatou que a aplicação de gel de PRP em feridas cutâneas humanas, com uma concentração plaquetária seis vezes superior ao valor fisiológico, resultou na antecipação da epitelização lesional e na normal deposição de tecido de granulação. Carter et al. (2003) referiram assim a aplicação de PRP como uma ferramenta terapêutica para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas situadas em locais pouco vascularizados e daquelas cujo processo de reparação tende a perpetuar-se. O PRP

também poderá ser aplicado em feridas cutâneas agudas de animais imunossuprimidos, diabéticos ou idosos, para providenciar uma rápida e boa cicatrização (Carter et al., 2003).

Figura 4 – Preparação (A) e aplicação (B) do gel PRP numa lesão cutânea localizada no membro distal de um cavalo



O gel foi preparado após a adição de 50 UI de trombina humana reconstituída em 1 ml de cloreto de cálcio. Adaptado de Monteiro. 2008

3.4. Vantagens e desvantagens do PRP

O PRP é uma terapia que, embora se resuma à distribuição de vários FC *in situ*, possui várias vantagens face às terapias convencionais e também face a outras terapias regenerativas, como método terapêutico para lesões tendinosas e ligamentosas. Este produto pode ser obtido e aplicado no momento do diagnóstico, no caso de lesões subagudas e crônicas, de um modo simples e relativamente pouco dispendioso (Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2009; Foster et al., 2009; Textor et al., 2011). Desta terapia não advém o risco de rejeição ou de transmissão de doenças infecciosas, visto ser uma terapia autóloga (Fortier, 2009). Quando o PRP é processado e administrado assepticamente, promove a regeneração tecidual através da estimulação da produção de um tecido semelhante ao normal que, em lesões músculo-esqueléticas, resulta no retorno mais célere do animal ao seu nível desportivo, com menor probabilidade de recorrência lesional. Uma única aplicação de PRP na fase inicial do processo de reparação tem um efeito relativamente duradouro. A iniciação da cascata de eventos celulares e moleculares pelos FC do PRP permite a rápida

redução da inflamação, seguida da formação de um tecido resistente no local da lesão (Ramirez, 2006). Deste modo, existe um avanço do processo de reparação que se mantém mesmo depois do efeito inicial dos FC ter desaparecido.

Já foi referenciado que o PRP estimula a migração e proliferação das MSCs. Existe a preocupação de que a sobre exposição celular ao PRP possa limitar a diferenciação dessas células em linhas apropriadas, ou seja, que o PRP possua efeito cancerígeno. No entanto, não existem dados que suportem esta hipótese, a qual não parece muito plausível, uma vez que o PRP é composto pelas plaquetas do próprio paciente e por uma concentração mais elevada de FC, mas em proporções fisiológicas (Foster et al., 2009). Os FC ligam-se à superfície externa da membrana plasmática das células do enxerto, bordos lesionais ou lesão através de receptores transmembranários. As MSCs, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epidérmicas expressam receptores membranários para os FC presentes no PRP. Estes receptores induzem a activação de um sinal proteico endógeno, levando à expressão de uma sequência genética normal da célula, de modo a induzir a sua proliferação e a síntese de componentes matriciais. Assim, os FC presentes no PRP não possuem características mutagénicas, porque não entram na célula nem no seu núcleo, actuando apenas através da estimulação do processo de reparação normal (Marx, 2004).

Tal como todas as terapias, a terapia com PRP possui algumas limitações. Embora alguns autores já tenham proposto uma concentração mínima de plaquetas no PRP para que a sua aplicação tenha benefícios na reparação tecidular (Marx, 2004), ainda está por definir um intervalo óptimo para a dose a utilizar. São necessários mais estudos controlados e prospectivos sobre a utilização de PRP em lesões músculo-esqueléticas, de modo a caracterizar a actuação dos FC a nível tecidular. Para tal, deverá ser definido o ambiente tecidular apropriado, o mecanismo de acção e o efeito clínico em cada tipo de tecido (Foster et al., 2009). É também necessária uma pesquisa mais aprofundada sobre os efeitos do PRP em diferentes localizações dentro do mesmo tecido. A junção músculo-tendinosa, a zona tênsil do tendão e a junção osteo-tendinosa podem responder de modo diferente à terapia com PRP, pois cada uma possui características únicas que as diferenciam (Wroblewski et al., 2010).

A investigação sobre a libertação de FC no PRP em equinos é escassa. Essa libertação pode variar substancialmente dependendo, por exemplo, do grau de activação das plaquetas durante o processo de preparação ou administração do PRP (Textor et al., 2011). Como existe falta de consenso sobre muitas das características técnicas desta terapia, ainda não foi concretizado um protocolo padronizado para a obtenção e aplicação do PRP. Assim, não só é dificultada a sua integração na literatura científica básica e a sua utilização na clínica comum, como também é posta em causa a validação das comparações entre os diversos estudos existentes (Pietrzak & Eppler, 2005; Foster et al., 2009). É por isso necessário elaborar um protocolo de terapia com PRP que permita aos mvs de equinos

(entre outros) efectuar a técnica com maior reprodutibilidade e obter resultados mais credíveis.

3.4.1. Comparação entre o PRP e outras terapias regenerativas

As novas áreas de terapia regenerativa exploradas envolvem as MSCs, a terapia genética, e os FC autólogos ou produzidos por bioengenharia (Fortier, 2011). Uma das características particulares do PRP é possuir uma grande concentração de FC em proporções biológicas. As citocinas exógenas, como a proteína morfogénica óssea (BMP), são produzidas através de tecnologia recombinante e administradas em grandes quantidades. As aplicações terapêuticas de FC recombinantes são limitadas, porque estas proteínas possuem um curto tempo de semi-vida, sendo necessárias administrações múltiplas contendo uma elevada concentração de factores (Santos et al., 2011). Devido à complexidade espaço-temporal dos eventos celulares e moleculares do processo de reparação, existem muitas limitações à utilização de terapias recombinantes com um único FC com vista a aumentar capacidade de regeneração tecidual (Foster et al., 2009).

A terapia genética baseia-se na estimulação da produção de FC pelas células presentes no tecido lesionado ou pelas células implantadas nesse local. Nesta terapia são transferidos, através de um vector, genes conhecidos por codificar proteínas terapêuticas num tecido alvo, apresentando-se como um método promissor para aumentar a concentração de FC no local da lesão (Huard, Li, Peng & Fu, 2003; Dahlgren, 2009). Os principais genes explorados são os genes responsáveis pela expressão de IGF-1, TGF- β 1 e β 2, e das proteínas morfogénicas 2 e 7 (Dahlgren, 2009). A transferência de genes codificantes de FC para o tecido alvo permite a produção de níveis terapêuticos destes FC no local desejado. Estes genes podem ser transferidos para o tecido alvo de modo directo, através de vectores virais ou não virais (plasmídeos bacterianos) que contêm ADN codificador de FC, ou de modo indirecto, através de células geneticamente manipuladas para produzirem esses factores (Santos et al., 2011). Esta tecnologia é geralmente associada à terapia regenerativa com células estaminais pluripotentes (Huard et al., 2003), devido à sua capacidade de auto-preservação e à possibilidade de se diferenciarem na linha celular desejada (Santos et al., 2011), embora em tecidos músculo-esqueléticos se utilizem comumente as MSCs. No entanto, esta tecnologia genética é ainda uma utopia para a MV na prática clínica devido à intensa investigação de que necessita. Neste momento, existe um número indeterminado de parâmetros e características por determinar e compreender nesta terapia, incluindo os genes envolvidos na resposta de reparação dos diferentes tecidos, a combinação adequada destes genes para se codificar a regeneração tecidual pelas MSCs, e em que ocasiões devem ser empregues nestas células para se obter um efeito terapêutico (Santos et al., 2011). Quando se utilizam vectores virais na terapia genética surgem problemas

relacionados com a biologia viral, incluindo a expressão apenas transitória dos genes alvo e as reacções imunológicas normais do organismo animal contra o vírus (Ramírez, 2006).

Segundo Schnabel et al. (2007), a concentração de PRP a 100% estimula um grande número de genes codificantes de moléculas matriciais sem aumentar, concomitantemente, a expressão de mediadores inflamatórios e das metaloproteínases 3 e 13. O PRP aumenta a expressão de ARN mensageiro de colagénio tipo I e III, de COMP, e o rácio colagénio tipo I: colagénio tipo III. No estudo de Schnabel et al. (2007), foram realizadas culturas de células do TFDS equino em várias concentrações de PRP, de aspirado de medula óssea, de sangue total e de plasma pobre em plaquetas (PPP), com o objectivo de comparar os padrões de expressão génica, de ADN e do colágeno formado. Ao contrário dos resultados obtidos com PRP a 100%, o aspirado de medula óssea a 100% aumentou significativamente a expressão de metaloproteinase-3 e de colagénio tipo III. No que respeita aos FC, as concentrações de TGF- β e PDGF foram superiores nas culturas celulares tendinosas em meio PRP comparando com o aspirado de medula óssea, PPP e sangue total, mas não se verificou diferença na concentração de IGF-I nos diferentes meios (Schnabel et al., 2007). No entanto, Smith et al. (2006) realizaram um estudo *in vitro* sobre os efeitos anabólicos da medula óssea acelular e do PRP nos fibroblastos do LSB equino, onde verificaram que os fibroblastos em cultura de medula óssea acelular a 10% sintetizaram mais COMP que os fibroblastos em cultura de PRP a 10%. Ou seja, a administração do PRP estimula a síntese fibroblástica de MEC nos ligamentos, mas os seus efeitos regenerativos são menos intensos que os observados após a aplicação de sobrenadante de medula óssea, talvez porque esta última contenha uma combinação mais adequada de FC para o tecido ligamentoso.

Na terapia com PRP, a proliferação de MSCs e a sua diferenciação estão directamente relacionadas com a concentração plaquetária. Segundo Marx (2004), ocorre uma resposta celular regenerativa após a exposição destas células aos FC libertados por uma concentração de plaquetas cerca de quatro vezes superior à concentração fisiológica. As células estaminais podem ser classificadas em três tipos: células estaminais totipotentes, que podem dar origem a um organismo inteiro; células estaminais pluripotentes, que podem dar origem às três linhagens celulares (ectoderme, mesoderme e endoderme); e células estaminais multipotentes (MSCs), células progenitoras derivadas da mesoderme que dão origem a células precursoras de tecidos mesenquimatosos (Dahlgren, 2009).

Existe actualmente um grande interesse terapêutico na aplicação de MSCs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo, em lesões tendinosas e ligamentosas de equinos (Sutter, 2007; Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011), principalmente na tendinopatia do TFDS e na desmíte do LSB (Ramírez, 2006). Apesar de existirem vários locais para recolha de MSCs, a medula óssea e o tecido adiposo são os locais mais utilizados na prática clínica, porque são locais de fácil recolha, causando morbilidade mínima (Richardson, Dudhia, Clegg & Smith, 2007). Não se sabe se as MSCs funcionam como células específicas do tecido onde são

colocadas, como os tenócitos, ou se a sua função é secretar FC imunomoduladores com vista a aperfeiçoar a reparação tecidular (Sutter, 2007; Fortier, 2011). Existem três técnicas para o tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas com MSCs derivadas da medula óssea: a administração directa de aspirado contendo uma população celular heterogénea; a administração após centrifugação do aspirado para concentrar MSCs; e a cultura das MSCs. A primeira técnica tem as vantagens do PRP: é uma técnica simples e pouco dispendiosa que pode ser aplicada logo após o diagnóstico (Sutter, 2007; Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011). Este preparado de medula óssea possui ainda a vantagem de possuir a base necessária para uma óptima regeneração: matriz, FC e células. No entanto tem a desvantagem de poder causar mineralização no local da lesão devido à presença de espículas ósseas no preparado (Fortier & Smith, 2008). Além do mais, a medula óssea normal contém apenas um pequeno número de MSCs, uma proporção de 1 MSC para 100000 células nucleadas (Smith et al., 2006). Quando se procede à centrifugação do aspirado, obtém-se uma concentração doze vezes superior ao aspirado inicial (Fortier & Smith, 2008).

Quando se pretende um grande número de MSCs, opta-se pela expansão das MSCs em laboratório, através da cultura de células removidas do aspirado da medula óssea para se obter 10×10^6 MSCs, valor recomendado para a administração intralesional desta terapia (Fortier, 2011). No entanto, são necessárias pelo menos três semanas de cultura para se obter tal quantidade (Sutter 2007; Fortier & Smith, 2008; Fortier, 2011). As MSCs obtidas podem ser suspensas num meio rico em FC, como o PRP, para fornecer todos os elementos necessários à regeneração tecidular (Sutter, 2007). Porém esta técnica é muito dispendiosa e morosa, exigindo um longo período de espera entre o diagnóstico e a sua aplicação. São necessários mais estudos para averiguar se os métodos laboratoriais de selecção celular para posterior cultura seleccionam a população de MSCs ideal para promover a regeneração tecidular (Sutter, 2007). Também deverão ser efectuados estudos para apurar se a manipulação laboratorial poderá alterar as características das MSCs, de modo a afectar a sua acção terapêutica *in situ* (Sutter, 2007).

O tecido adiposo também é uma boa fonte de MSCs, cujas características biológicas se assemelham às MSCs da medula óssea (Fortier & Smith, 2008). A técnica de obtenção das MSCs a partir do tecido adiposo inicia-se com a remoção cirúrgica de uma porção deste tecido da zona da base da cauda (Sutter, 2007). Através da digestão enzimática do conteúdo adiposo, obtém-se a fracção celular que contém entre 1 a 3% de MSCs, quantidade 100 a 300 vezes superior à colhida a partir da medula óssea (Dahlgren, 2009). Depois de alguns passos de centrifugação e suspensão, a solução obtida é administrada na lesão, não sendo necessária a cultura celular. Esta técnica fornece, num curto espaço de tempo (cerca de 48 horas), maior concentração de células nucleadas que o aspirado de medula óssea (Sutter, 2007; Fortier, 2011). As MSCs devem ser colocadas num meio

contendo FC para que seja estimulada a sua proliferação e diferenciação (Sutter, 2007), porque nos tecidos tendinosos e ligamentosos lesionados a concentração local de FC poderá ser insuficiente para induzir tal efeito.

Neste momento, está a emergir uma nova terapia regenerativa para o tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas em equinos, baseada na utilização de soro autólogo condicionado (ACS) produzido a partir de uma amostra de sangue (Cissell, 2009). Tal como na terapia com PRP, a utilização da terapia com ACS foi directamente extrapolada da medicina desportiva humana para a MV, inicialmente como meio de tratamento da OA equina. Os seus efeitos são baseados numa reacção físico-química que resulta na produção de FC e de mediadores anti-inflamatórios pelos leucócitos, e na sua libertação para o soro sanguíneo. A proteína antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) é o mediador anti-inflamatório protagonista desta terapia, sendo que a sua produção endógena local aumenta com a administração de ACS. Até ao momento, não foram elaborados estudos controlados sobre a sua utilização em lesões tendinosas ou ligamentosas, mas é uma terapia que pode entrar em voga no seu tratamento porque, teoricamente, poderá ter efeitos benéficos na reparação destas estruturas e, além do mais, está bastante acessível ao mv de equinos (Cissell, 2009).

3.5. Métodos de obtenção de PRP

A utilização do PRP generalizou-se nas áreas de clínica e cirurgia equina nos últimos 5 anos, principalmente como um método de tratamento intralesional de lesões tendinosas e ligamentosas. Nesta área já existem vários protocolos de preparação e aplicação de PRP, mas ainda não está determinado o protocolo mais eficaz para estas lesões, porque a presente utilização clínica da terapia ultrapassou em larga escala a pesquisa até agora realizada (Textor et al., 2011).

O PRP é um produto sanguíneo autólogo que possui uma concentração plaquetária superior aos níveis fisiológicos. Esta definição é muito generalista para definir o produto obtido através dos vários sistemas de produção de concentrados plaquetários disponíveis ao mv, pois todos diferem na quantidade, qualidade e até no modo de apresentação do produto final (Carter et al., 2003; Ramírez, 2006; McLellan & Plevin, 2011). Alguns autores, com o objectivo de caracterizar e avaliar os diferentes sistemas, utilizam nomenclatura de acordo com as diferentes técnicas de obtenção de PRP. Ramirez (2006) descreve três métodos para obter PRP: o método de aférese (automático); o método do *buffy-coat* (semi-automático); e o método dos tubos (manual). Já Wroblewski et al. (2010) utilizam as denominações: sequestração gravitacional de plaquetas, que engloba a separação dos componentes do sangue contendo anticoagulante, através de processos de centrifugação; técnica padronizada de separação celular, realizada através de máquinas de processamento automático e fechado; e técnica de filtração selectiva ou plaquetaférese, que utiliza um filtro descartável para capturar as plaquetas a partir do sangue total. Existem autores que dividem

o método de centrifugação em método automático (fechado) ou manual (aberto), consoante o PRP é obtido através de uma centrífuga e recipientes específicos ou com tubos de colheita estéreis e uma centrífuga normal, respectivamente (Carmona et al., 2007; McLellan & Plevin, 2011; Textor et al., 2011).

3.5.1. Características dos métodos de obtenção

As características mais importantes para a avaliação do método de preparação são a eficiência da colecção de plaquetas, a reprodutibilidade e a esterilidade do produto final. Muitos autores também defendem que deve ser avaliada a concentração de leucócitos e o nível de activação plaquetária do PRP (Ramírez, 2006; Fortier, 2009; McLellan & Plevin, 2011; Textor et al., 2011). As principais diferenças operacionais entre sistemas são o volume de sangue requerido e a manipulação técnica da amostra durante o processo de centrifugação e/ou separação sanguínea (Foster et al., 2009; McLellan & Plevin, 2011). Em termos de resultados, a diferença fundamental baseia-se no rendimento da concentração plaquetária e de FC. No entanto, não existem evidências científicas para considerar a superioridade de um sistema sobre outro, em parte devido à falta de informação sobre a concentração ideal de plaquetas e FC, e porque tecidos diferentes possuem diferentes requisitos biológicos para a sua reparação (Foster, 2009; McLellan & Plevin, 2011). Fortier (2009) afirma que, devido ao efeito de saturação dos receptores de FC, uma concentração de plaquetas quatro vezes superior aos níveis sanguíneos é suficiente para maximizar a resposta dos tecidos tendinosos e ligamentosos saudáveis aos FC libertados, afirmando, no entanto, que desconhece a resposta destes tecidos a essa concentração em caso de lesão. No entanto, Marx (2004) verificou que a proliferação e a diferenciação de MSCs estão directamente relacionadas com a concentração plaquetária. Ele demonstrou a relação através de uma curva dose-resposta, que se inicia com uma concentração de plaquetas quatro vezes superior ao nível fisiológico. Alguns autores extrapolaram este limite para a MV, considerando que a meta de concentração plaquetária de um qualquer dispositivo de preparação de PRP em equinos não deve ser inferior a esse valor (Smith et al., 2006; Sutter, 2007). Mas existem outros autores que relatam bons resultados em lesões músculo-esqueléticas de equinos com a administração de PRP contendo apenas uma concentração plaquetária de 1,72 vezes o valor fisiológico (Ramírez et al., 2006; Júnior et al., 2009; Araújo, Júnior, Panza & Ramos, 2009), o que não invalida a possibilidade da obtenção de melhores resultados com uma maior concentração.

Todas as técnicas de preparação, descritas anteriormente, possuem vantagens e desvantagens. O sistema de aférese requer um nível tecnológico elevado, pessoal qualificado no manuseamento dos instrumentos, e um elevado volume de sangue comparativamente às outras técnicas (mais de 450 ml) (Ramírez, 2006). Devido a esses factores, não é conveniente a sua utilização em ambiente de clínica. A vantagem desta

técnica baseia-se no diminuto risco de ocorrência de contaminação bacteriana, distinguindo-se por isso entre as técnicas de preparação do PRP (Ramírez, 2006).

Os sistemas de centrifugação fechados (ou método *buffy coat*) possuem algumas vantagens técnicas em relação aos métodos de aférese e dos tubos. No geral, estes sistemas de centrifugação automáticos têm uma elevada eficiência, podendo concentrar mais de 1000×10^3 plaquetas/ μ l (Ramírez, 2006; McLellan & Plevin, 2011). Para Ramírez (2006), este valor é muito superior ao obtido pelo método dos tubos. No entanto, é um valor inferior ao atingido por Textor e seus colaboradores (2011) através da sua versão do método manual, que envolve centrifugações com maior força gravitacional (até 400g) durante mais tempo (15 minutos) que o protocolo descrito pelo autor anterior.

O risco de contaminação da preparação PRP a partir dos sistemas fechados é menor que a partir do método manual, podendo ser facilmente utilizados em pequenas clínicas (Ramírez, 2006; McLellan & Plevin, 2011). Devido à elevada reprodutibilidade das técnicas automatizadas, o PRP é produzido de uma forma consistente quanto ao número de plaquetas e FC (McLellan & Plevin, 2011). Como desvantagem, estes dispositivos também concentram grandes quantidades de leucócitos (Ramírez, 2006), e tornam os tratamentos dispendiosos, sendo necessária a aquisição de uma centrífuga e de material de processamento especializados (McLellan & Plevin, 2011).

O método dos tubos é fácil de executar e é pouco dispendioso porque, ao contrário da técnica automatizada, não necessita de aparelhos específicos. No entanto, envolve um número superior de estádios de processamento e manipulação, tornando-o um método bastante mais susceptível à contaminação e aos erros de operador (McLellan & Plevin, 2011). Neste caso, para que seja mantida a esterilidade do produto, é necessário que a técnica de preparação seja estritamente asséptica (Ramírez, 2006), devendo-se também utilizar sistematicamente os mesmos parâmetros de centrifugação para diminuir o grau de variação na concentração de plaquetas obtidas, que se poderá revelar bastante elevado na técnica manual (McLellan & Plevin, 2011).

Os métodos de centrifugação manual e automatizado são os mais utilizados em MV para produzir PRP. O volume de PRP obtido através destas técnicas ronda os 10% de volume do sangue total extraído e, para serem obtidos valores mais elevados de plaquetas no concentrado, o sangue é retirado de veias periféricas (Pietrzak & Eppley, 2005), principalmente da veia jugular. A preparação do PRP inicia-se com a adição de citrato ao sangue total para inibir a cascata da coagulação, uma vez que só pode ser produzido a partir de sangue anticoagulado (Foster et al., 2009).

A centrifugação separa o sangue total em três camadas, consoante a sua densidade: camada eritrocitária, com densidade 1,09; camada intermédia, composta por plaquetas e leucócitos, conhecida como camada flogística com 1,06 de densidade; e o plasma, a camada mais superficial, com 1,03 de densidade (Pietrzak & Eppley, 2005; Wroblewski et

al., 2010). A camada flogística encontra-se na interface eritrocitária e plasmática, onde se encontram concentradas as plaquetas. As plaquetas maiores e mais recentemente sintetizadas, ou seja, com maior actividade metabólica, encontram-se principalmente no milímetro superior da camada eritrocitária (Marx et al., 1998).

Dependendo da técnica, do dispositivo utilizado, ou mesmo por escolha do mv, o PRP pode conter quantidades variáveis de plasma, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. No método dos tubos utiliza-se maioritariamente o sistema de dupla centrifugação. Este produz uma concentração plaquetária relativamente boa, mas envolve maior manipulação no processamento. A centrifugação simples é menos utilizada porque além de concentrar menos plaquetas, induz uma maior activação das plaquetas equinas durante o processamento do PRP, o que significa uma maior quantidade de FC descartada no sobrenadante (Ramírez, 2006; McLellan & Plevin, 2011). No método de dupla centrifugação, a primeira fase do processo separa a camada eritrocitária e flogística do plasma, e a segunda concentra mais as plaquetas, separando o PRP do PPP. A força e a duração da centrifugação devem ser tomadas em consideração para assegurar a reprodutibilidade do método, porque podem levar a diferenças na concentração de plaquetas (Wroblewski et al., 2010). A utilização de citrato (ACD-A) como anticoagulante, assim como a utilização de baixa força gravitacional durante a centrifugação, são passos essenciais para a preservação da integridade da membrana plasmática das plaquetas (Pietrzak & Eppeley, 2005). O processo de centrifugação deve concentrar as plaquetas sem provocar dano ou lise nestas células. A activação plaquetária é necessária para a conclusão da estrutura terciária dos FC proteicos, por isso, quando as plaquetas são danificadas ou se tornam inviáveis pelo processamento do sangue, são libertadas grandes quantidades de factores com bioactividade comprometida. Não é recomendável a utilização de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante, porque é um quelante de cálcio irreversível, não permitindo a posterior formação do coágulo, e porque danifica as plaquetas (Landesberg, Roy & Glickman, 2000).

Devido ao facto dos leucócitos e das plaquetas se situarem na camada flogística após a primeira centrifugação, muitos dos métodos disponíveis concentram ambos estes tipos celulares. Em termos de regeneração tecidular, isto pode ser contra produtivo, sendo recomendada por alguns autores a exclusão dos leucócitos das preparações (McLellan & Plevin, 2005). Estas células podem exacerbar o dano inicial ao tecido porque libertam mediadores pro-inflamatórios, tais como IL-1, TNF- α , IL-6, metaloproteinasas 8 e 9, e radicais de oxigénio. Mas, por outro lado, os leucócitos têm um efeito terapêutico através do aumento da concentração de FC no PRP e através da actividade anti-infecciosa que conferem ao composto. Na área da clínica equina, muitos investigadores recomendam uma concentração máxima de leucócitos entre 0,1 a $3,0 \times 10^3/\mu\text{l}$, para prevenir a acumulação das citocinas (McLellan & Plevin, 2005). Por falta de investigação, desconhece-se o verdadeiro

significado da presença destas células no PRP, não existindo ainda nenhuma evidência conclusiva indicando que se devam incluir ou excluir os leucócitos do composto (McLellan & Plevin, 2005).

Fortier (2009) afirma que o PRP pode ser congelado a -20°C durante seis meses sem perder os FC activos e, desta forma, os leucócitos sofrem lise e não libertam as citocinas pró-inflamatórias. No entanto, Textor et al. (2011) afirmam que a congelação das plaquetas resulta na agressão à membrana plasmática com perda do conteúdo celular, ou seja, libertação de FC biologicamente inactivos.

3.5.2. Protocolo do método dos tubos

O protocolo de preparação do PRP a partir do método dos tubos, com dupla centrifugação, é o mais utilizado pelos mv de equinos, e também amplamente utilizado no *Hippiatrica Equine Medical Center* (Anexo 2).

Tabela 3 – Relação entre a concentração dos constituintes do sangue total e do PRP obtido pelo método dos tubos

Constituintes	Sangue total	PRP (método dos tubos)
HT (%)	30,75 [†]	2,63 [†]
Leucócitos	5,86x10 ³ /μl [‡]	2 vezes superior*
Plaquetas	112x10 ³ /μl [†]	2* - 10 [‡] vezes superior
TGF-β ₁	5,5 ng/ml*	1,3 [‡] - 3* vezes superior

Dados retirados de [†] Schnabel et al. (2007), [‡]Textor et al. (2011), e *Ramírez (2006)

Este método inicia-se com a colheita asséptica da quantidade de sangue pretendida a partir da veia jugular para tubos de colheita estéreis, com capacidade de 4,5 ml e contendo 3,2% de citrato de sódio (Figura 5) (Ramírez, 2006). Para a colheita sanguínea pode ser utilizado um catéter com um gauge elevado, porque no estudo de Textor e seus colaboradores (2011) ficou claro que a utilização de agulhas de gauge elevado (21 e 25G) não contribui para a activação das plaquetas, nem causa danos nas mesmas. Os tubos contendo o sangue anticoagulado são então colocados na centrífuga a 120g durante cinco minutos (Ramírez, 2006). Depois da remoção dos tubos da centrífuga é verificada a estratificação sanguínea (Figura 6), e a seguir é removido cerca de 50% do plasma adjacente à camada flogística (Figura 7) (Ramírez, 2006). O plasma obtido a partir de todos os tubos de 4,5 ml é colocado em tubos secos de maior capacidade para ser de novo centrifugado (Figura 8), desta vez a 240 g durante cinco minutos (Ramírez, 2006). Após esta segunda centrifugação, o plasma fica dividido em PPP e PRP (Figura 9), removendo-se para uma seringa estéril 25% da porção inferior do plasma (PRP) de cada tubo, para posterior administração (Ramírez, 2006; Prades, 2007; Araújo et al., 2009; Júnior et al., 2009).

Consoante a preferência do executante, poderá ser adicionado cloreto de cálcio (4,5mEq/ml de plasma) ao PRP para acelerar a activação das plaquetas (Ramírez, 2006).

Ramírez (2006) determinou a quantidade de plaquetas, leucócitos e TGF- β presentes no PRP elaborado pelo método manual. O PRP assim formulado possui concentrações de $250 \pm 71,8 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, $8,68 \pm 3,78 \times 10^3$ leucócitos/ μ l e $12,515 \pm 2,443 \times 10^3$ pg/ μ l de TGF- β (Ramírez, 2006). Conforme descrito na tabela 3, a diferença da concentração de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e FC entre o sangue e o PRP obtido através desta técnica pode ser substancialmente elevada. Estas diferenças são o reflexo da personalização do protocolo do método manual por alguns autores (Schnabel et al., 2007; Maia et al., 2009; Textor et al., 2011). As pequenas alterações técnicas que propõem resultam em variações na concentração dos diferentes elementos do PRP. O desfecho da reparação tecidular poderá encontrar-se altamente dependente destas variações.

Figura 5 – Colheita de sangue da veia jugular após tricotomia e limpeza asséptica do local

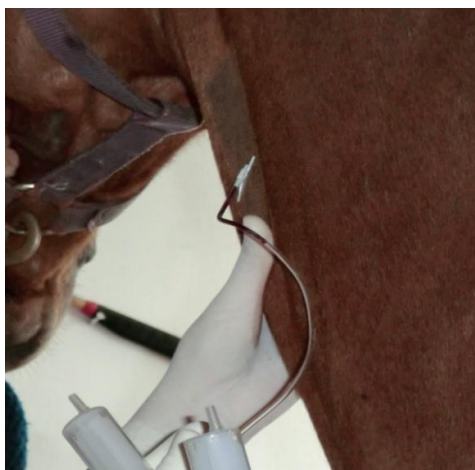


Figura 6 – Tubos de 4,5 ml após centrifugação do sangue a 120 g



Figura 7 - Extracção de 25% do plasma adjacente à camada flogística

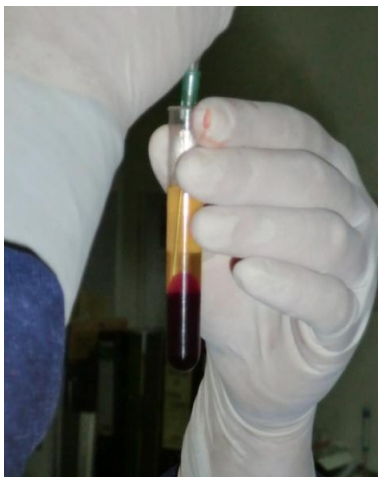


Figura 8 – Colocação do produto de todos os tubos de 4,5 ml em tubos de 10 ml



Figura 9 – Composto obtido após centrifugação de tubos secos de 10 ml



Cedido por *Hippiatrica*

3.6. Método de aplicação e administração de PRP

O potencial regenerador do PRP depende da quantidade de FC libertados após activação plaquetária, a qual depende da quantidade desses FC presente nos grânulos α das plaquetas, da técnica de processamento do sangue, e também da plenitude da activação plaquetária após o contacto com os tecidos alvo (Pietrzak & Eppley, 2005). Convencionalmente, têm sido utilizados para activação das plaquetas a trombina e o cálcio. Após a adição destes produtos ocorre activação plaquetária, por isso a aplicação do PRP deve ser efectuada cerca de 10 minutos após o seu início, pois a subsequente secreção do conteúdo granular ocorre rapidamente. Se a adição de trombina ou cálcio ao PRP não for efectuada apenas poucos minutos antes da sua administração, ocorre a produção de um gel que não pode ser injectado, limitando o seu uso a certos procedimentos cirúrgicos (Wroblewski et al., 2010).

A activação do PRP também ocorre pela sua exposição ao colagénio que, por sua vez, abunda no tecido músculo-esquelético (Wroblewski et al., 2010). Assim, devido à presença do colagénio *in situ*, ocorre activação plaquetária logo após a administração de PRP na zona da lesão tendinosa ou ligamentosa (Textor et al., 2011). Textor et al. (2011) revelaram no seu estudo que a libertação de PDGF- $\beta\beta$ e TGF- $\beta 1$ é dependente da concentração de colagénio presente no tecido lesional. Por estes motivos, o colagénio tipo I tem sido avaliado como uma boa alternativa à utilização de trombina e cálcio. A activação *in vivo* das plaquetas através do colagénio tipo I tem a vantagem de induzir a formação lenta do coágulo, assegurando uma libertação também lenta dos FC na área de interesse, podendo ser considerado um activador superior aos restantes, do ponto de vista terapêutico (Foster et al., 2009; Mishra et al., 2009). A utilização prática deste conceito resulta na remoção de um passo no protocolo de produção de PRP, diminuindo o risco de contaminação por erro de operador. Do mesmo modo, poderá ser utilizada uma agulha de baixo calibre, visto a preparação ser menos viscosa, oferecendo também um maior intervalo de tempo entre a preparação do composto e a sua aplicação, de modo a dar ao clínico mais tempo para efectuar uma correcta localização ultrassonográfica do local a injectar. Neste contexto, Marx (2004) demonstrou que o PRP, quando desenvolvido no seu estado anticoagulado e colocado numa mesa cirúrgica estéril, pode manter-se viável até oito horas após a sua preparação.

Dada a importância da activação plaquetária no funcionamento da terapia PRP, seria muito importante saber o nível de activação que uma dada preparação pode atingir. A activação plaquetária pode ser quantificada através do doseamento de P-selectina, uma proteína contida na face interna da membrana do grânulo α . A partir da fusão deste grânulo com a membrana plaquetária, ocorre a exibição da proteína P-selectina à superfície da plaqueta, onde poderá ser laboratorialmente doseada, revelando o grau de activação que ocorreu em cada formulação de PRP (Pietrzak & Eppley, 2005).

Geralmente, o PRP é administrado no tecido afectado sete a dez dias depois da lesão, quando a resposta inflamatória se apresenta bastante mais moderada (Fortier, 2011). A administração deste composto poderá ser efectuada com o animal em estação (Figura 10) sob o efeito de sedativos, ou em decúbito lateral sob anestesia geral, conforme os procedimentos a efectuar e o temperamento do animal.

Deverá ser utilizada uma agulha com um diâmetro pequeno, pois usualmente é necessário penetrar tecido tendinoso ou ligamentoso saudável para ter acesso à zona lesada. A agulha de 22G é indicada para a maioria das localizações, tendo em conta que agulhas menores podem dificultar a injeção do composto. Nas localizações que requerem injeções profundas, como a origem do LSB, deve-se utilizar uma agulha de 18 a 20G para evitar a potencial quebra da mesma (Sutter, 2007).

A ultrassonografia pode ser utilizada durante a administração de PRP para permitir ao mv o controlo da profundidade de inserção da agulha, resultando na colocação precisa da mesma dentro da lesão. A radiografia é apenas utilizada em locais onde a ultrassonografia deixa de ser útil, como na zona do casco. Para uma melhor visualização do posicionamento da agulha, deve-se colocar a sonda do ecógrafo numa posição transversa e perpendicular à orientação da mesma. A agulha deve ser inserida longitudinalmente para facilitar o

Figura 10 – Administração intralesional de PRP com o animal em estação



Cedido por *Hippiatrica*

preenchimento da área lesionada entre os fascículos tendinosos, e evitar a ocorrência de danos iatrogénicos no tendão saudável. Uma vez penetrada a pele, a agulha deve ser direccionada para a sonda. A confirmação por ecografia da colocação intralesional da agulha a cada 2 a 3 cm, antes da administração, é um método eficaz para distribuir correctamente o PRP ao longo da lesão (Sutter, 2007).

O uso de anestésico local, antes ou simultaneamente à aplicação de PRP, está contra-indicado. Este procedimento poderá alterar o pH do local de forma a diminuir a eficácia do tratamento, porque algumas das moléculas de interesse do PRP possuem um

intervalo pH óptimo de actuação (Foster et al., 2009).

O volume a introduzir é subjectivo. Depende sobretudo do tamanho da lesão e da quantidade de PRP produzida. O tamanho da lesão pode ser calculado de um modo grosseiro através da ecografia, identificando-se o diâmetro e o comprimento da mesma. Sutter (2007) descreve um método simples em que injecta cerca de um mililitro de PRP por cada 3% de área de lesão calculada através das imagens transversas. A maioria das lesões tendinosas ou ligamentosas poderá receber facilmente entre 3 a 6 ml de PRP (Sutter, 2007).

A técnica de injeção multiplanar deste composto é recomendada para que ocorra dispersão plaquetária numa área mais ampla, e para assim melhorar a capacidade regeneradora do PRP (Foster et al., 2009).

É importante que não sejam administrados AINEs nas primeiras duas semanas após administração do PRP, porque inibem a cascata inflamatória normal e, deste modo, poderão inibir os efeitos benéficos iniciais do PRP (Foster et al., 2009).

3.7. Técnicas sinérgicas associadas à terapia com PRP

Todas as técnicas que envolvem a necessidade de ocorrência do processo de cicatrização beneficiam da terapia com PRP, uma vez que todo o processo é acelerado e se obtém um tecido com melhores características biológicas. O contrário também sucede, ou seja, a associação de outras terapias para aumentar as probabilidades de sucesso do PRP.

Devido a todas as complicações inerentes às lesões tendinosas e ligamentosas, existe a necessidade de potenciar os efeitos regenerativos do PRP. Este objectivo torna-se primordial no caso das lesões crónicas e/ou recorrentes, onde já ocorreu perda permanente das características do tecido devido à formação de uma cicatriz. Segundo Torrealba (2011), a combinação da aplicação de PRP com outros métodos terapêuticos potencia a sua acção reparadora, nomeadamente no que se refere a algumas técnicas cirúrgicas e de reabilitação (comunicação pessoal, Setembro 21, 2011).

Dada a sua importância no processo de reparação dos tecidos músculo-esqueléticos, e pelo facto de aumentar a probabilidade do sucesso da terapia com PRP, a reabilitação física será um tema discutido no capítulo 5. Seguidamente será discutida a possibilidade da conjugação de algumas técnicas cirúrgicas e de outras terapias regenerativas com a terapia com PRP, ou vice-versa, como tentativa de melhorar os resultados obtidos.

3.7.1. Técnicas cirúrgicas

Nesta pequena secção serão referidos alguns aspectos do *splitting* percutâneo do tendão ou ligamento, devido à sua relativa importância para a terapia com PRP. A artroscopia é outra técnica cirúrgica que beneficiaria e seria beneficiada por esta terapia, mas a conjugação de ambas no tratamento de lesões tendinosas e ligamentosas, principalmente em rupturas, é um assunto recente que surge apenas disponível na literatura de medicina desportiva no Homem (Vidriero, Goulding, Simon, Sanchez & Johnson, 2010). Devido a esse facto, este tema não será discutido.

O *splitting* do tendão, ou tenoplastia tendinosa como denomina Ross (2011), é um método complementar para o manejo da tendinite do TFDS. Foi inicialmente utilizado para promover a vascularização do tendão em cavalos com tendinite crónica, e rapidamente abandonado após o aparecimento de estudos que comprovaram a indução da produção excessiva de tecido de granulação e o atraso na resolução da necrose tecidual do tendão, meses após a

sua execução. Em estudos consequentes de modelos de tendinite aguda, utilizou-se o *splitting* do TFDS associado à desmotomia do ligamento acessório do TFDS. Verificou-se que a junção das duas técnicas melhorava a reparação e estimulava revascularização tecidual (Ross, 2011).

Actualmente, esta técnica cirúrgica é utilizada na fase aguda e sub-aguda das lesões tendinosas centrais, denominadas *core lesion*, como meio de descomprimir zonas hemorrágicas, permitindo a evacuação de exsudados inflamatórios e fornecendo canais de acesso aos vasos sanguíneos em crescimento (Ross, 1997). Este procedimento cirúrgico deverá ser efectuado preferencialmente três a cinco dias após a lesão, quando a técnica oferece mais benefícios ao prevenir danos adicionais no tendão, mas poderá ser efectuada até às duas semanas (Ross, 1997; Smith & Goodship, 2004; Ross, 2011). Cerca de oito a doze dias depois desta cirurgia, é possível verificar uma redução significativa do tamanho da lesão e do diâmetro do tendão (Dabareiner et al., 2000).

Nas lesões crónicas, quando o tecido de granulação já ocupa grande parte da área lesionada, o efeito de descompressão é negligenciável. No entanto, Ramírez (2006) refere que o *splitting* do tendão ou do ligamento também deverá ser efectuado nas lesões crónicas, atingindo o centro da lesão de modo a estimular uma resposta hemorrágica e a providenciar acesso local a células da circulação sanguínea (MSCs) e aos componentes do PRP, cuja administração é efectuada seguidamente a este procedimento cirúrgico nas lesões crónicas. Na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center* efectua-se na maioria dos casos o *splitting* cirúrgico ecoguiado antes da administração do PRP.

Geralmente não se realiza o *splitting* de ligamentos, excepto em casos de desmíte refractária ao repouso, ou quando a lesão ainda é evidente depois de dois meses de repouso e terapia conservativa (Dabareiner et al., 2000).

Figura 11 - *Splitting* ecoguiado do TFDS com o cavalo em decúbito lateral sob o efeito de anestesia geral



Cedido por *Hippiatrica*

Mesmo sendo uma técnica simples, o equino deve estar devidamente contido (de preferência anestesiado), e o clínico executante deve possuir alguma experiência, tanto cirúrgica como ecográfica, para evitar danos adicionais aos tecidos peritendinosos e às fibras tendinosas saudáveis. A técnica percutânea com recurso a uma lâmina cirúrgica de dois gumes (tenótomo) é a mais utilizada (Ross, 2011), embora outros autores

afirmem que o *splitting* poderá ser executado com lâminas de bisturi número 11 (Dabareiner et al., 2000). Esta técnica

envolve múltiplas incisões na porção tumefacta do tendão, que poderão ser efectuadas de forma cega, por palpação da lesão ou, preferencialmente, guiadas por ultrassonografia

(Figura 11), permitindo a incisão precisa da lesão e evitando danos colaterais no tecido saudável (Dabareiner et al., 2000). Após o procedimento não é necessário suturar as incisões cutâneas, apenas devendo ser aplicadas compressas estéreis no local, envoltas com uma ligadura compressiva (Dabareiner et al., 2000) para ajudar na drenagem dos exsudados inflamatórios.

3.7.2. Outras terapias regenerativas

Embora seja necessária uma grande pesquisa na área, a terapia com PRP pode ser conjugada com terapias celulares regenerativas, tais como as MSCs derivadas do tecido adiposo e da medula óssea. A estratégia é colocar na lesão uma trilogia potente: células regenerativas, matriz de fibrina e FC (Sutter, 2007; Fortier, 2011). No caso das tendinites crónicas ocorre redução da população de tenócitos, e as células restantes encontram-se metabolicamente comprometidas devido à acção das citocinas catabólicas (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011), não reagindo aos FC do PRP como pretendido (Ramírez, 2006). Neste sentido, a aplicação conjunta das terapias regenerativas com MSCs e PRP faria todo o sentido como opção de tratamento de tendinites crónicas avançadas.

Actualmente, a engenharia tecidual requer a interacção entre estes três constituintes: uma população celular que possa ser manipulada para se diferenciar no tecido de interesse; um material que forme uma rede tridimensional onde as células se poderão diferenciar e produzir matriz; uma sinalização molecular que induza todos os processos da regeneração tecidual (Clegg, 2008). A utilização de diferentes produtos origina diferentes efeitos biológicos (Clegg, 2008) e, se forem conjugados, poderão agir de modo sinérgico para dar origem a um tecido com qualidade superior àquele que produzem quando utilizados isoladamente.

4. Exame Ultrassonográfico

As tendinites e as desmites ameaçam o percurso atlético dos equinos, porque os seus sinais clínicos iniciais são muito subtis e por vezes intermitentes (Gillis, 2007), passando despercebidos a quem convive com o animal que, geralmente, só reconhece a lesão tardiamente, quando esta adquire características de grande severidade. A ultrassonografia começou a ser utilizada para fins diagnósticos de lesões tendinosas e ligamentosas a nível dos membros de equinos no início dos anos 80. Actualmente é muito utilizada na avaliação de tendões e ligamentos para a identificação, confirmação e monitorização de lesões (Rantanen, Jorgensen & Genovese, 2011).

As sondas ecográficas lineares são as mais utilizadas na verificação de tendões e ligamentos devido à facilidade que oferecem no reconhecimento anatómico das estruturas, e

sobretudo na avaliação longitudinal do alinhamento das suas fibras (Reef, 1998; Rantanen et al., 2011). É necessária a utilização de uma almofada de silicone com características ecogénicas semelhantes à água e adaptável à sonda, denominada em inglês por *standoff pad*. Este vai servir como meio físico de interposição entre as sondas de elevada definição normalmente utilizadas (com 7 a 10 MHz) e a pele, de forma a criar distância que permita a observação mais cuidada das estruturas tendinosas e ligamentosas mais superficiais, tal como o TFDS (Rantanen et al., 2011). A almofada, sendo composta por um material maleável, facilita ainda a adaptação da sonda ao membro do cavalo, que é uma estrutura de superfície não plana.

A técnica geral do exame ultrassonográfico inicia-se com a preparação do animal, que deve encontrar-se bem contido e calmo de forma a não apresentar perigo para o examinador nem para o aparelho, permitindo também a elaboração de um exame ecográfico minucioso para se obter imagens de qualidade. Segue-se a preparação da zona sujeita a exame. É muito importante a correcta preparação do pêlo e da pele da zona a examinar, porque uma tricotomia e limpeza incompletas levam à produção de artefactos ecográficos e a uma menor definição das estruturas, o que, por sua vez, dificulta a interpretação das imagens pelo clínico. Os artefactos ecográficos, por vezes confundidos com lesões, são também produzidos durante a visualização das estruturas devido ao incorrecto posicionamento da sonda. Esta deve-se encontrar perpendicularmente alinhada (90º) às estruturas que estão a ser avaliadas, pois deste modo há maior reflexão dos ecos até à sonda (Rantanen et al., 2011).

Geralmente, inicia-se a visualização das estruturas com uma sonda de 7,5 MHz revestida pelo *standoff pad*, e uma profundidade visível entre 4 a 6 cm. Uma sonda de 10 MHz seria ideal para visualização de estruturas mais superficiais e de menor calibre, como os tendões extensores e os ligamentos colaterais, porque a profundidade visual permitida, situada entre 2 a 4 cm, é suficiente para as observar. A não utilização do *standoff pad* serve para visualizar estruturas mais profundas em pormenor (Reef, 1998).

4.1. Caracterização ultrassonográfica das lesões tendinosas e ligamentosas

Após uma avaliação clínica sugestiva de lesão tendinosa ou ligamentosa, deverá ser efectuado o exame ultrassonográfico para confirmar o diagnóstico e determinar o grau de severidade da lesão. Os parâmetros ultrassonográficos essenciais para caracterizar, avaliar e monitorizar as lesões tendinosas e ligamentosas são: a área de corte transversal (CSA); a percentagem de CSA que a lesão ocupa; a ecogenicidade da lesão (escala de cinzentos); e o nível de organização dos feixes nas imagens ecográficas longitudinais ou o padrão de alinhamento das fibras (FAS) (Jorgensen et al., 2011; Rantanen et al., 2011).

Os sinais ecográficos de lesão aguda dos tendões ou dos ligamentos englobam o aumento do diâmetro, a variação anormal do padrão ecogénico (hipoecogénico a anecogénico), a redução do padrão estriado nas imagens longitudinais, e as alterações na forma, margens e posição do tendão ou ligamento. A patologia tendinosa ou ligamentosa crónica está associada a diferentes graus de espessura e ecogenicidade, e também a um padrão fibrilar irregular, indicadores da presença de tecido fibroso (Smith & Goodship, 2004; Gillis, 2007). Segundo Smith e Goodship (2004), o clínico deverá ter em mente que a avaliação ecográfica da lesão aguda é mais precisa quando realizada quatro a sete dias após a ocorrência lesional, embora Rantanen et al. (2011) e Jorgensen et al. (2011) sugiram que poderá ser realizada apenas após 2 a 3 dias. Este facto deve-se à existência tendencial de um aumento da CSA e de alteração da ecogenicidade da lesão durante a fase inflamatória, tornando difícil a correcta categorização do grau de severidade da lesão (Rantanen et al., 2011).

4.1.1. Ecogenicidade

A ecogenicidade dos tendões é baseada na densidade e no arranjo altamente estruturado da MEC. Os tendões são demonstrados um padrão ecográfico regular gerado na interface entre os feixes tendinosos e o endotendão (Bosch et al., 2011). Cada estrutura possui um padrão específico de ecogenicidade consoante a localização anatómica (Rantanen et al., 2011). Além disso a avaliação da ecogenicidade tende a ser subjectiva, dependendo dos ajustes de imagem no equipamento e da técnica de exploração do operador.

Tabela 4 - Graus de ecogenicidade dos tecidos tendinosos e ligamentosos

Grau	Descrição da Estrutura
0	Isoecogénica
1	Ligeiramente hipoecogénica, maioritariamente ecogénica
2	50% Ecogénica e 50% anecogénica
3	Maioritariamente ou totalmente anecogénica

Adaptado de Rantanen, Jorgensen e Genovese (2011).

As lesões tendinosas e ligamentosas agudas são caracterizadas pela desintegração dos feixes, originando uma ecogenicidade menos intensa (hipoecogénica) e mais irregular, cuja variação depende da consistência morfológica da lesão aquando do exame. Já as lesões crónicas revelam uma mistura de tecido cicatricial hiperecogénico com regiões hipoecogénicas onde existe um pouco de reactividade lesional (Gillis, 2007). De acordo com Rantanen et al. (2011) e Reef (1998), poderá ser utilizado um sistema numérico padrão com vista a uma maior objectividade na classificação de uma lesão. Na tabela 4 estão

enumerados os quatro graus de ecogenicidade utilizados para descrever as lesões tendinosas e ligamentosas.

4.1.2. Padrão de alinhamento das fibras

A verificação do alinhamento dos fascículos tendinosos e ligamentosos ao longo das linhas de tensão axial é realizada através da colocação da sonda linear numa posição sagital em relação ao membro, de modo a se observar um corte longitudinal das estruturas. Neste modo de visualização, as fibras tendinosas e ligamentosas normais apresentam-se como estruturas ecogénicas contínuas ao longo da imagem, porque os fascículos de colagénio estão paralelamente alinhados ao eixo maior da estrutura, originando um FAS regularmente linear (Rantanen et al., 2011).

A visualização longitudinal pode ajudar a determinar a localização e a extensão da lesão aguda através da observação de zonas de indefinição hipo ou anecogénicas, onde ocorreu a interrupção de fibras (Gillis, 2007). Nas lesões crónicas, ou durante o processo de remodelação lesional, não se observa um padrão hiperecogénico linear, mas sim aleatório, derivado da existência de tecido cicatricial cujas fibras de colagénio, sobretudo do tipo III,

Tabela 5 - Classificação do Alinhamento das Fibras de Tendões e Ligamentos

Escala	Percentagem de fibras paralelas
0	Mais de 75%
1	Entre 50 a 75%
2	Entre 25 a 50%
3	Menos de 25%

Adaptado de Rantanen, Jorgensen e Genovese (2011)

são mais curtas e possuem um maior número de ligações cruzadas. Nesta situação, enquanto na imagem transversal é observada uma melhoria no padrão de ecogenicidade do tendão ou ligamento lesionado, esta não é correspondida na imagem longitudinal, onde pode ainda ser difícil discernir um padrão linear das fibras (Rantanen et al., 2011).

Tal como para a ecogenicidade, também existe um sistema semiquantitativo de classificação para o alinhamento das fibras dos tendões ou ligamentos, descrito na tabela 5.

4.1.3. Área do corte transversal

A determinação da CSA de tendões e ligamentos é realizada nas imagens transversas, sendo um parâmetro muito importante para caracterizar o significado clínico de zonas hipoecogénicas, e até para detectar tumefacções subtis não acompanhadas de outras alterações ecogénicas, como uma tendinite numa fase muito inicial. A CSA permite determinar se, após uma lesão tendinosa ou ligamentosa, ocorreu aumento de espessura na totalidade ou apenas numa determinada zona da estrutura, por comparação com valores esperados para a idade, tamanho e raça do equino, ou pela medição da CSA da mesma estrutura do membro contralateral (Rantanen et al., 2011). Após uma lesão tendinosa ou

ligamentosa ocorre um aumento da CSA da estrutura, concomitante à diminuição da ecogenicidade e à separação das fibras, devido à acumulação de infiltrados inflamatórios, de transudados (resultando em edema), ou de sangue derivado de hemorragia intratendinosa (Reef, 1998). A zona mais inflamada e frágil do tendão ou ligamento corresponde ao local onde existe maior proporção hipoeecogénica na CSA, ou onde existe um maior aumento comparativamente à mesma zona do membro contralateral (Rantanen et al., 2011).

O tamanho total da estrutura é obtido através da soma das CSA (cm^2) de cada zona. Para se obter a percentagem correspondente à extensão total da lesão ao longo do tendão, somam-se as CSA da lesão de todas as zonas lesionadas da estrutura. Depois, a CSA total da lesão é dividida pela CSA total da estrutura e o resultado é multiplicado por cem. A percentagem resultante é uma estimativa do comprometimento do tendão ou ligamento, utilizada para caracterizar e monitorizar a lesão (Rantanen et al., 2011).

Determinar a CSA de uma lesão ao longo do programa de reabilitação física permite avaliar a progressão do processo de reparação, pois uma diminuição da CSA indica que está a ocorrer a resolução da componente inflamatória do processo ou uma favorável remodelação do tecido lesionado (Reef, 1998; Rantanen et al., 2011).

4.1.4. Designação de zonas ecográficas

Para obter informação diagnóstica fidedigna através da ecografia das estruturas, é necessário que as imagens sejam de alta qualidade e que o clínico realize o exame de forma metódica e padronizada. É essencial documentar a localização exacta de cada imagem porque os tendões e os ligamentos possuem diferentes formas e tamanhos ao longo do seu comprimento. A designação da localização anatómica de uma imagem ecográfica é feita através da medição da distância a um ponto de referência fixo, ou dividindo o membro em zonas. A região distal do membro anterior, concretamente a região metacárpica e metacarpofalângica palmar, é dividida em 7 zonas distintas. Segundo vários autores (Reef, 1998; Rantanen et al., 2011), temos a zona zero (0) a partir da saliência do osso acessório do carpo e 5 cm ao longo da região medial do carpo. Seguidamente temos as zonas 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B e 3C. No membro posterior temos como referência a ponta do calcâneo, e as zonas correspondentes ao membro anterior são 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B e 4C. Estes autores também dividem a região da quartela.

Gillis (2007) expressa a sua preferência em medir a localização de um determinado ponto com uma fita métrica, tendo como referência o ponto 0 (zero) já referido. Isto porque as zonas pré-determinadas podem sofrer variações entre exames e entre diferentes examinadores (Gillis, 2007). Por isso, mesmo com a aplicação do método descritivo por zonas deve-se registar a distância entre a sonda e o ponto de referência, e também examinar o membro contralateral, pois as lesões tendinosas possuem geralmente carácter

bilateral. O comprimento da lesão deve ser medido em centímetros e deve-se determinar o número de zonas afectadas (Rantanen et al., 2011). Em cada uma dessas zonas, ao longo do comprimento do tendão ou ligamento, deverá ser classificada a CSA estrutural, a CSA da lesão, a ecogenicidade estrutural e a FAS, para se obter a avaliação da totalidade da lesão (Rantanen et al., 2011).

4.1.5. Classificação ultrassonográfica das lesões

A classificação ultrassonográfica das afecções tendinosas e ligamentosas é necessária para a determinação do seu prognóstico, para a determinação da terapêutica mais correcta, e é essencial para elaborar um protocolo de reabilitação ajustado à lesão e ao animal. Existe alguma discrepância entre autores na classificação ecográfica de lesões tendinosas e ligamentosas, o que pode suscitar alguma dificuldade na compreensão e interpretação de dados entre mv. No entanto, todos os autores baseiam a tipificação e diferenciação do nível de severidade lesional nas medições ultrassonográficas quantitativas e qualitativas acima descritas. Para que o capítulo não se prolongue em demasia, apenas irá ser descrita por completo a classificação de um dos autores.

Rantanen et al. (2011) descrevem a sua escala (escala de Rantanen), que divide as lesões tendinosas e ligamentosas em seis categorias. As duas primeiras categorias desta escala não são indicativas de lesão. O autor caracteriza a lesão pelo seu grau de severidade em mínima (categoria III), ligeira (categoria IV), moderada (categoria V) e severa (categoria VI). É apenas a partir da lesão moderada que se observa algum grau de claudicação (Rantanen et al., 2011).

Gillis (1997) baseia-se principalmente na CSA do tendão ou ligamento da zona onde a lesão é máxima, na percentagem de CSA da lesão, e na CSA total de lesão ao longo do comprimento da estrutura para classificar a lesão em ligeira, moderada e severa.

Reef (1998) também divide as lesões segundo a sua severidade, mas em quatro tipos diferentes, numerando-as de 1 a 4. A lesão do tipo 1 apresenta-se ligeiramente hipoecogénica em relação ao tecido normal (ecogenicidade de grau 1), e a estrutura envolvida possui uma FAS pouco alterada (grau 0-1). Na lesão do tipo 2, a estrutura afectada apresenta 50% de ecogenicidade normal e 50% está anecogénica (grau 2), já com ruptura de fibras (FAS grau 2) e inflamação local. Na lesão do tipo 3 a estrutura apresenta uma CSA maioritariamente anecogénica (ecogenicidade de grau 3) com elevada percentagem de fibras interrompidas (FAS grau 2). As lesões do tipo 4 encontram-se completamente anecóicas (ecogenicidade grau 3) e há a indicação de separação total das fibras dentro da lesão (FAS grau 3), com consequente formação de hematoma (Reef, 1998).

4.2. Exames ultrassonográficos de seguimento

A ultrassonografia é um óptimo meio imagiológico para efectuar exames sequenciais a tecidos moles, porque é baseada numa tecnologia segura, não invasiva e relativamente pouco dispendiosa, que oferece ao clínico uma ideia precisa de como se encontra a estrutura analisada em tempo real (Gillis, 2007).

A utilização de exames ecográficos sequenciais como forma de seguimento das lesões tendinosas e ligamentosas é essencial para o prognóstico da lesão, no que respeita à modalidade desportiva praticada, e para um bom acompanhamento do protocolo reabilitacional instituído pelo mv. Deste modo, o mv poderá verificar e otimizar o progresso da reparação tecidular, adaptando da melhor forma o exercício ao grau de esforço que as estruturas afectadas podem exercer nesse momento, ou seja, adaptando o programa de reabilitação à fase de reparação da lesão (Rantanen et al., 2011). A personalização do programa ao animal e à lesão permite iniciar ou aumentar no momento certo a carga física nas estruturas alvo, diminuindo o risco de recidiva devido a exercício excessivo resultante de uma evolução demasiado precoce do protocolo, e evitando uma reparação inadequada devido à formação de uma cicatriz de qualidade inferior quando a elevação do grau de exercício é efectuada tardiamente. Esta técnica também permite a detecção precoce de sinais de nova lesão, oferecendo ao mv a possibilidade de alterar alguns aspectos do maneio do equino ou da terapêutica efectuada durante o período de recuperação (Gillis, 2007).

Segundo Gillis (2007), pequenas alterações nos parâmetros ultrassonográficos de tendões e ligamentos estão associadas a grandes alterações nos parâmetros da força biomecânica dessas estruturas. É sobre esse princípio que a avaliação ultrassonográfica deve basear-se, englobando a descrição de todos parâmetros quantitativos e qualitativos, porque a evolução favorável de um só parâmetro não significa uma evolução favorável da lesão no seu global. Numa perspectiva ultrassonográfica da reparação da lesão tendinosa, o padrão de ecogenicidade recupera normalmente de uma forma mais rápida que o FAS (Rantanen, 2011), acentuando a importância da determinação de todos os parâmetros ecográficos na determinação da progressão da intensidade de exercício. Quando o tecido em reparação ainda se encontra na fase inicial de remodelação, existe um atraso na melhoria do FAS, sugerindo que o mv deve recorrer a um avanço mais conservador no nível de exercício programado (Rantanen et al., 2011). No entanto, as vantagens de utilizar os métodos ecográficos quantitativos e qualitativos em junção com os achados clínicos vão além do diagnóstico e caracterização da lesão. São a base de comparação para os exames de seguimento durante a reabilitação, e podem aumentar a colaboração do proprietário com o mv assistente, pois oferecem dados concretos que lhe permitem entender a situação do seu cavalo, e perceber a importância do cumprimento de todo processo de reabilitação indicado pelo mv (Rantanen et al., 2011). No caso da terapia com PRP, estes métodos são a base da

qualificação de uma lesão para aplicações subsequentes de PRP. Fortier (2009) aconselha a aplicação de uma segunda dose de PRP quando ao exame ecográfico efectuado aos 30 dias após a primeira aplicação, a lesão não apresente pelo menos 50% de melhorias nos parâmetros ecográficos.

Gillis (2007) caracteriza o processo de reparação em bom, razoável e fraco, consoante os parâmetros ecográficos obtidos numa determinada fase da lesão. À medida que o nível de exercício de reabilitação vai aumentando, a CSA da estrutura lesionada diminui ou mantém-se. Existem variações normais na CSA total, na ordem dos 5%, que não estão relacionadas com a recorrência lesional. No entanto, um aumento superior a 20% da CSA de uma determinada zona e superior a 10% da CSA total da lesão, indica que está iminente a recidiva (Reef, 1998). Dyson (2004) concluiu no seu estudo sobre o tratamento de tendinites do TFDS, que uma FAS de grau 3 neste tendão (menos de 50% de fibras paralelas) aos quatro meses após lesão está directamente relacionada com a ocorrência de recidiva lesional quando o equino inicia o trabalho a galope. Ou seja, existe uma relação directa entre a qualidade da reparação observada ecograficamente e a incidência de recorrência da lesão tendinosa. Isto enfatiza o valor das ecografias de seguimento da reparação tendinosa e ligamentosa na diminuição da taxa de recidiva lesional.

Os exames ultrassonográficos de seguimento permitem ao mv o controlo do rumo do nível de exercício durante a reabilitação de uma lesão tendinosa ou ligamentosa, ao possibilitar a avaliação da qualidade do tecido em reparação e, deste modo, poder recomendar a terapia mais apropriada à óptima evolução da lesão (Gillis, 2007). Inicialmente, o intervalo entre exames de monitorização ultrassonográfica depende do protocolo de reabilitação proposto e da intervenção médica inicial. Neste caso, temos como exemplo a administração intralesional de PRP ou a desmotomia do ligamento anular, que necessitam de períodos de repouso e planos de reabilitação completamente diferentes. Gillis (2007) determina que os exames de seguimento devem ser efectuados em intervalos de seis a oito semanas após o diagnóstico inicial por duas razões: é quando se dá o avanço no protocolo de reabilitação para um nível mais intenso; o tecido cicatricial produzido pode ainda não ter qualidade para suportar carga. No último caso, o mv assistente poderá optar por outro esquema de exercícios ou instituir nova terapia (Gillis, 2007). Abellanet e Prades (2009b) efectuaram exames ecográficos de seguimento aos 35 dias, aos 2 e aos 4 meses após o tratamento de lesões tendinosas com PRP. No *Hippiatrica Equine Medical Center* efectuam-se ecografias de controlo a cada quatro semanas após esta terapia, até que a lesão se encontre totalmente reparada/regenerada.

4.3. O método inovador “Ultrasonographic Tissue Characterisation”

A eficácia das novas terapias para as lesões tendinosas e ligamentosas é difícil de determinar e a sua avaliação é muitas vezes baseada em métodos semi-quantitativos, tal

como a análise da escala de cinzentos das imagens ecográficas das lesões, ou a escala subjectiva de graus de dor determinados no exame de claudicação (Bosch et al., 2011). Devido à demora no processo de cicatrização de lesões tendinosas e ligamentosas, é importante ter uma ideia dos efeitos de uma determinada terapia no decorrer da reparação, de modo a modificá-la atempadamente caso se revele ineficaz. Bosch et al. (2011) utilizaram o método de caracterização ultrassonográfica dos tecidos (UTC – “Ultrasonographic Tissue Characterisation”), um método baseado numa análise matemática de imagens ecográficas transversas contíguas, para monitorizar todos os aspectos do processo de reparação de lesões tendinosas de modo a aferir a eficácia da terapia com PRP. A UTC é considerada uma técnica fácil de realizar e não requer equipamento muito sofisticado ou dispendioso, e ainda permite a avaliação da reparação tecidular de uma forma objectiva e não invasiva.

A escala de cinzentos e o FAS são insuficientes para avaliar de modo preciso o nível de reparação das lesões tendinosas, não demonstrando o estágio em que a reparação se encontra, porque a desintegração das fibras tendinosas é um processo tridimensional. A UTC armazena, ao longo do eixo maior do tendão, imagens transversas adjacentes a distâncias regulares, de modo a criar uma imagem ultrassonográfica tridimensional. Para efectuar esta técnica ultrassonográfica é necessário um ecógrafo conectado a um computador com um software específico, uns braços metálicos que apoiam a sonda, e um padrão de definição da imagem ecográfica para efeitos de reprodutibilidade (Bosch et al., 2011).

Este programa de caracterização tecidular por ultrassonografia também permite clinicamente o estabelecimento de programas de reabilitação mais apropriados à fase em que se encontra o processo de reparação. Por fim, este método ainda poderá revelar a sequência dos principais eventos da cicatrização, podendo vir a ser uma ferramenta muito útil em futuras investigações sobre novas terapias para lesões tendinosas e ligamentosas, e quem sabe, até revelar os mecanismos de acção das mesmas (Bosch et al., 2011).

5. Protocolo de reabilitação física

Por ano, 13% dos equinos que praticam desportos competitivos sofrem lesões de tecidos moles em que é necessário um período de repouso (Smith & Goodship, 2004). Os parâmetros da força biomecânica dos tendões (tipo de colagénio, celularidade, padrão ondulado) requerem no mínimo seis meses de recuperação para iniciarem o retorno aos valores normais (Gillis, 2007), mas os tendões podem levar cerca de 8 a 14 meses a recuperar a sua força tênsil normal (Smith & Goodship, 2004). O confinamento e o exercício reabilitacional necessários à correcta cicatrização destes tecidos são dispendiosos e

morosos, mas essenciais para um prognóstico favorável à recuperação do desempenho desportivo do equino (Gillis, 1997; Smith & Goodship, 2004; Jorgensen et al., 2011).

Um regime de reabilitação controlado é crítico para uma reparação tendinosa ou ligamentosa bem sucedida, para a restauração das funções locomotoras sem claudicação e para a prevenção de nova lesão (Fortier, 2011), sendo por isso essencial para o sucesso de qualquer terapia. O princípio básico do exercício controlado, que consta no plano de reabilitação, é ajudar na resolução da inflamação e na manutenção da função deslizante do tendão ao longo do período de repouso (Gillis, 1997). A carga mecânica controlada é um elemento essencial à regeneração e reparação tendinosa e ligamentosa, porque melhora o processo de remodelação ao estimular a actividade dos tenócitos (Smith & Goodship, 2004) através da indução da expressão génica e da síntese de proteínas matriciais (Wang, 2006). Existem dois tipos de mobilização: a activa e a passiva. A mobilização activa envolve movimento tendinoso dentro da bainha através da aplicação de tensão no tendão lesionado por contracção do músculo (Lin et al., 2004). A mobilização passiva envolve apenas movimento do tendão reparado sem a aplicação de forças músculo-tendinosas (Lin et al., 2004). Nos equinos não é possível efectuar a movimentação passiva, sendo por isso importante que as estruturas sejam movimentadas de forma activa, inicialmente de modo muito moderado. A mobilização precoce e progressiva melhora a qualidade do tecido reparado, que é o objectivo primordial na fase fibroblástica (Smith & Goodship, 2004; Smith, 2011). Várias avaliações experimentais e clínicas de lesões tendinosas, submetidas a mobilização precoce após cirurgia, resultaram no aumento da força tênsil do tendão e na redução da formação de adesões, comparativamente a controlos sujeitos a imobilização (Wang, 2006). Lin e os seus colaboradores (2004) afirmam que os tendões imobilizados demonstram propriedades mecânicas diminuídas, uma recuperação funcional retardada e aumento na formação de adesões. Wang (2006) explica que a imobilização destas estruturas estimula a formação de fibras de colagénio irregulares e desiguais. Sabe-se também que a aplicação de carga em tendinites crónicas alivia a sintomatologia associada a esta afecção (Wang, 2006).

O problema mais comum durante a reabilitação de lesões tendinosas e ligamentosas em equinos é a exposição precoce da estrutura lesionada a cargas elevadas, o que poderá provocar agudização da lesão (Gillis, 1997). No entanto, se o exercício não for avançado no tempo correcto, existe perda da produtividade atlética do cavalo. O animal deixa de claudicar após algumas semanas de repouso (Gillis, 2007), muito antes da formação de um tecido cicatricial resistente à carga, o que pode conduzir à colocação precoce do equino em trabalho regular por parte de um proprietário/tratador mal informado. O proprietário deve ser por isso advertido da duração da reabilitação do seu animal e que o possível retorno ao trabalho normal está dependente da qualidade dessa mesma reabilitação.

Devido ao comportamento agitado típico da espécie equina quando se encontra em liberdade, o confinamento do animal é crucial para o controlo do seu repouso. No entanto, é necessário oferecer condições para diminuir a situação de excesso de carga na estrutura afectada, como uma boxe adequada ao tamanho do animal e colocação de uma cama não muito alta, ou seja, mais consistente. Em animais muito activos poderá ser necessário colocar um equino calmo como vizinho, colocar à disposição uma alimentação pouco energética, mas que atenda às necessidades nutricionais de um animal de desporto e, em último recurso, utilizar a sedação de longa duração (Gillis, 2007). Os protocolos de reabilitação iniciam-se com um período de confinamento em boxe intercalado com períodos variáveis de caminhada a passo à mão, a posterior possibilidade do animal ser montado e a adição progressiva de curtos períodos de trote e galope (Dabareiner et al., 2000; Gillis, 2004; Gillis, 2007; Jorgensen et al., 2011; Rantanen et al., 2011). A duração e a quantidade de exercício imposto até ao primeiro exame de seguimento deverão ser baseadas na severidade da lesão tendinosa ou ligamentosa, determinada no diagnóstico inicial (Gillis, 1997; Rantanen et al., 2011). Seguidamente, o exercício controlado deve ser ajustado conforme os achados obtidos nos exames ecográficos de controlo. Fortier (2009) possui um protocolo de reabilitação para a terapia com PRP, onde o período de repouso na boxe é intercalado com 10 minutos de caminhada a passo duas vezes por dia, aos quais são adicionados 5 minutos semanais por caminhada, até um máximo de 30 minutos e até ao exame ultrassonográfico de seguimento.

Como já foi referido, com a aplicação de métodos terapêuticos tradicionais, a resolução completa de uma lesão tendinosa ou ligamentosa envolve muitos meses de repouso. A utilização do PRP aliada a um protocolo reabilitacional adequado permite um avanço biológico na reparação destes tecidos. Ou seja, permite ao mv otimizar o tempo de recobro do animal, reduzindo assim a perda de produtividade associada a este tipo de afecções. Ramírez (2006) relatou casos de equinos com tendinite do TFDS de grau IV/V (escala de Rantanen) que 5,5 meses depois da terapia com PRP retornaram à actividade atlética prévia, sem recidivar. Na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center* tem sido aplicado, com bastante sucesso, um protocolo de exercício controlado não convencional onde o animal retorna ao seu trabalho regular cerca de 7 a 8 semanas após a terapia com PRP (Anexo 3), dependendo das características ultrassonográficas da estrutura tendinosa ou ligamentosa nesse momento.

O tipo de trabalho executado pelo equino determina em parte a intensidade dos exercícios que constam no final do protocolo de reabilitação (Smith & Goodship, 2004; Rantanen et al., 2011). A descrição exhaustiva dos protocolos para cada modalidade desportiva vai, no entanto, além dos objectivos deste trabalho.

III. CASOS CLÍNICOS

Durante o estágio na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center* foram acompanhados seis casos de lesões tendinosas e ligamentosas em cavalos de desporto, dos quais cinco corresponderam a tendinite na região tênsil do TFDS, e um correspondeu a uma desmíte do ligamento sesamoideu oblíquo lateral concomitante a uma tendinite do TFDP na região da quartela. Dois dos casos de tendinite do TFDS não serão descritos porque os animais regressaram ao seu país de origem logo após o tratamento, não havendo informação acerca do progresso da sua recuperação. Além do PRP foram aplicados outros tratamentos por opção do orientador. Estes encontram-se descritos nos casos clínicos correspondentes.

O caso 4 foi referenciado para a clínica, mas o mv que acompanhou todo o processo de reabilitação posteriormente à administração de PRP disponibilizou todos os dados e imagens ecográficas necessários para uma boa documentação do caso. Como os exames ecográficos foram efectuados com diferentes ecografos, um portátil e um fixo, as imagens ecográficas documentadas são diferentes devido a diferentes definições e características de imagem dos aparelhos.

Caso Clínico 1

Este caso refere-se a um equino de raça Belgian Sport Horse, macho castrado de 9 anos de idade utilizado em saltos de obstáculos, cuja consulta inicial teve como estímulo iatrogénico uma tumefacção na região palmar do membro anterior direito (MAD) (Figura 12), que surgiu após o treino diário. Devido à localização da tumefacção efectuou-se o exame de claudicação estático para observar e palpar todas as estruturas da zona. A tumefacção na região flexora do MAD revelou-se dolorosa e quente à palpação, confirmando-se a

Figura 12 - Tumefacção no terço médio da região metacárpica palmar do membro anterior direito



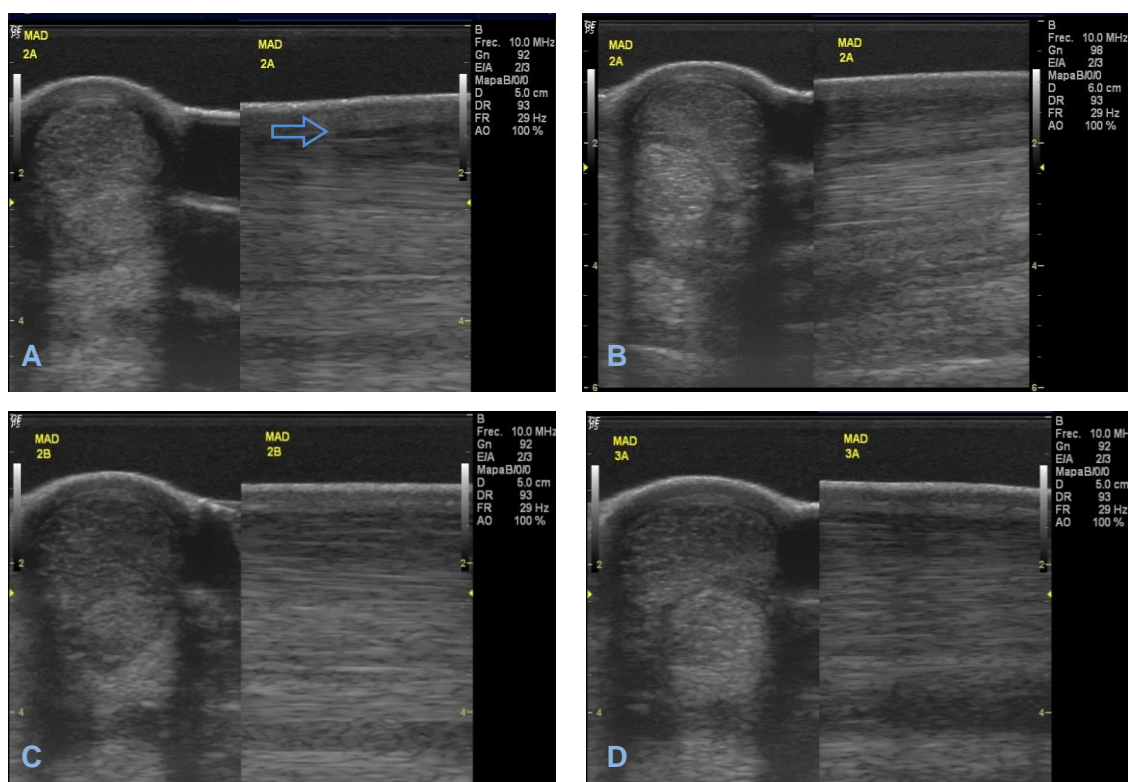
existência de inflamação. No exame de claudicação dinâmico o cavalo demonstrou apenas grau um em cinco de claudicação no MAD (1/5) a trote em linha recta, tanto no piso mole como no duro.

Embora o diagnóstico diferencial se encontre limitado devido ao facto do TFDS ser rapidamente palpado e separado de estruturas mais profundas, podemos ter como diagnósticos diferenciais:

- Edema/hematoma subcutâneo;
- Dermatite/foliculite;
- Tendinite do TFDS/TFDP;
- Desmite do LATFDP;
- Fractura do osso metacárpico rudimentar II ou IV.

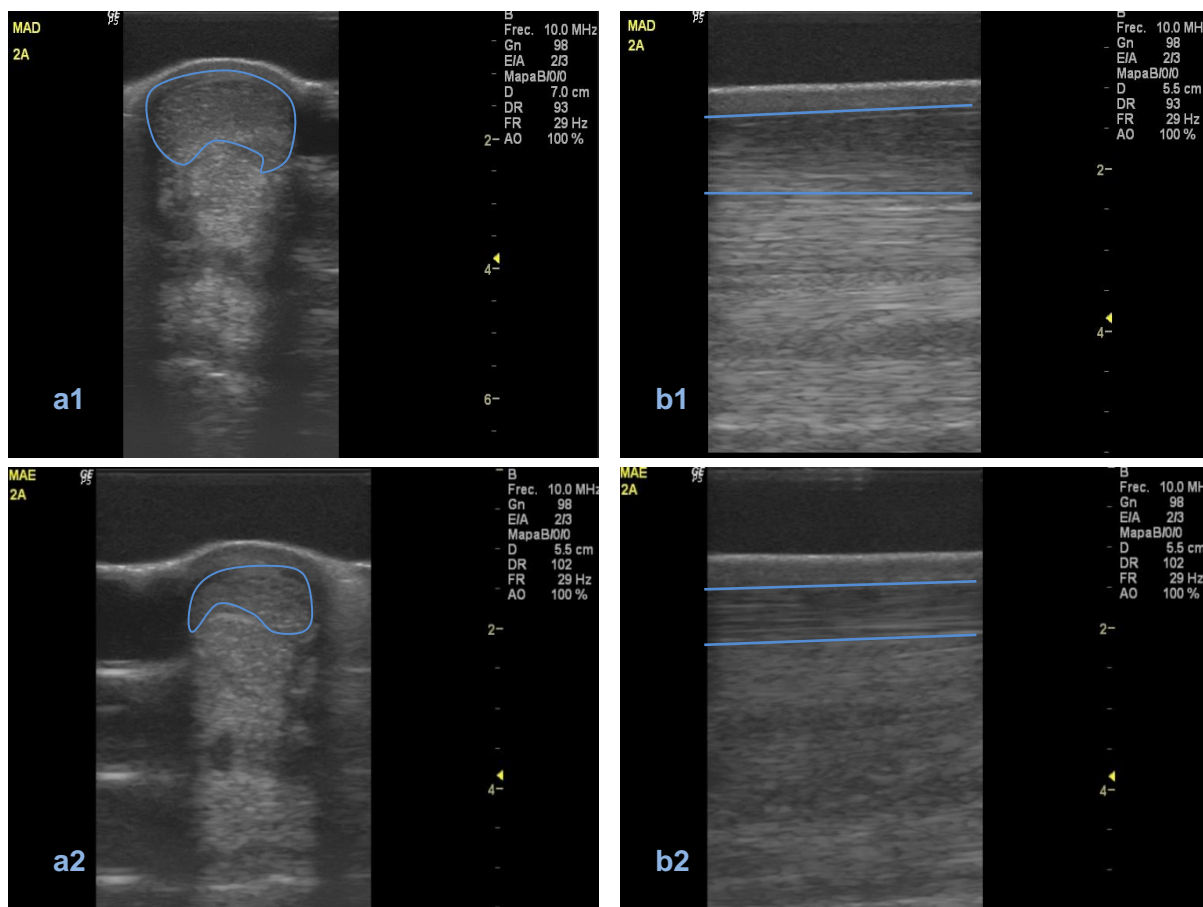
De seguida foi efectuado o exame ultrassonográfico por ser a técnica imagiológica mais indicada para diferenciar as principais afecções enumeradas. Identificou-se uma lesão no TFDS representada na Figura 13, com início na zona ecográfica 2A, ou seja, 12 cm distal ao carpo acessório na zona tênsil do tendão, e término na zona 3A. O diagnóstico definitivo foi tendinite aguda do TFDS.

Figura 13 - Imagens ecográficas transversais e longitudinais da extensão total da lesão no tendão flexor digital superficial do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as constantes utilizadas



Exame ecográfico de diagnóstico: **A** – zona 2A onde cerca de 50% do TFDS se encontra hipoeecogénico; na imagem longitudinal a seta azul indica o início da lesão. **B** – região mais distal da zona 2A onde, na imagem transversal, cerca de 75% do TFDS se encontra hipoeecogénico e com fascículos de tamanho superior ao normal. **C** – zona 2B onde quase 100% do TFDS se encontra hipoeecogénico e com CSA aumentada. **D** – zona 3A onde cerca de 75% do TFDS está hipoeecogénico e com CSA aumentada. (cedido por *Hippiatrica*)

Figura 14 - Imagens ecográficas transversais (a1 e a2) e longitudinais (b1 e b2) da zona 2A dos membros anteriores direito e esquerdo, obtidas 5 semanas após o diagnóstico, com as constantes utilizadas



Exame ecográfico de confirmação: comparando **a1** com **a2** denota-se que o TFDS do MAD possui um aumento substancial da CSA, com consequente deslocação das estruturas adjacentes; comparativamente a **b2**, em **b1** existe aumento da espessura do TFDS coincidindo com aumento da CSA observado em **a1**, com consequente ausência do padrão linear típico das fibras e uma maior hipoecogenicidade. (cedido por *Hippiatrica*)

Como os proprietários não optaram pela paragem do trabalho normal do equino, o mv instituiu uma terapia anti-inflamatória composta pela aplicação de crioterapia na zona afectada durante 15 minutos duas vezes ao dia, seguida de uma massagem intensa da região tumefacta, com a posterior colocação de ligaduras compressivas no membro afectado, durante cinco dias. O mv prescreveu ainda a administração de fenilbutazona na dose de 2,2 mg/kg por via oral, duas vezes ao dia durante três dias, e aconselhou que o cavalo fosse caminhado à mão durante 15 minutos duas vezes por dia, pelo menos durante uma semana.

Só 33 dias após o diagnóstico, por motivos alheios ao mv, foi aplicada a terapia com PRP na lesão. A região metacarpiana palmar do MAD não possuía sinais inflamatórios além da tumefacção que, através da palpação, se determinou ter origem no TFDS. Efectuou-se novo exame ecográfico onde se determinou, de um modo subjectivo, que a região 2A do TFDS do MAD possuía uma ecogenicidade mais regular na imagem transversal comparativamente ao

exame anterior, e na imagem longitudinal um padrão de alinhamento das fibras também mais regular mas ainda com uma imagem muito hipoecogénica (Figura 14).

Depois de verificada a extensão da lesão após a fase inflamatória para determinar a quantidade necessária de PRP, seguiu-se a cirurgia. O protocolo utilizado para a obtenção de PRP está exposto de forma genérica no Anexo 2. Com o animal sob anestesia geral e colocado em decúbito lateral esquerdo, foi efectuado primeiramente o *splitting* ecoguiado do TFDS seguido da administração também ecoguiada de PRP, sendo este distribuído ao longo de toda a extensão da lesão. A zona intervencionada do MAD foi seguidamente coberta por uma ligadura compressiva composta por compressas estéreis para isolar as pequenas soluções de continuidade da pele, seguida de três camadas de algodão e várias camadas de ligadura coesiva externamente.

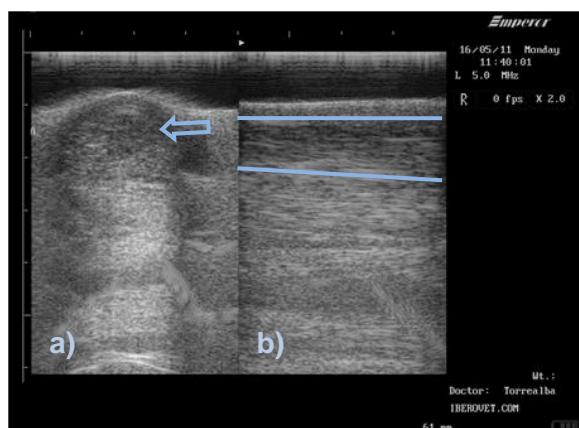
O protocolo de reabilitação imposto está exposto no Anexo 3, e foi baseado no grau de severidade da lesão, no efeito do PRP sobre o tecido tendinoso lesionado e também na experiência clínica do mv. Este engloba apenas oito semanas de exercício controlado, podendo o animal retomar ao seu nível anterior de trabalho após esse período de tempo caso o exame ecográfico de acompanhamento tenha parecer favorável. No internamento foi efectuada analgesia pós-cirúrgica com fenilbutazona na dose de 4,4 mg/kg por via endovenosa, duas vezes ao dia durante três dias, e também profilaxia anti-microbiana através da administração de cefquinoma na dose de 1mg/kg, por via intramuscular, e gentamicina na dose de 6,6 mg/kg por via endovenosa, ambas uma vez ao dia durante cinco dias. A ligadura foi trocada a cada dois dias, sendo removida ao dia sete após cirurgia. Iniciou-se o programa de reabilitação dois dias depois da cirurgia, onde o equino foi caminhado a passo durante 15 minutos à mão, uma vez de manhã e outra à tarde.

Após a semana de internamento, o TFDS encontrava-se menos tumefacto. Realizou-se uma ecografia de controlo que demonstrou um preenchimento mais ecogénico da lesão e um aumento da organização das fibras na vista longitudinal, mas a lesão ainda era perfeitamente identificável. O animal recebeu alta e foi reencaminhado para os proprietários levando como recomendação a continuação do plano de reabilitação já iniciado.

Entretanto, na quarta semana de reabilitação, durante a consulta de monitorização, constatou-se que o animal já se encontrava a trabalhar a galope quando deveria estar a fazer 30 minutos a passo montado seguidos de uma sessão de 15 minutos composta por intervalos de 3 minutos a passo e 1 minuto a trote, e finalização com 20 minutos a passo. O resultado foi uma recidiva da tumefacção e de outros sinais de inflamação. Foi efectuado um exame ecográfico de seguimento, para confirmar se o local lesionado possuía características ecográficas de uma boa reparação lesional, indicativa da capacidade da estrutura de suportar maiores cargas sem o risco de recidiva. Este exame não foi favorável porque, tal como é verificado na Figura 15, ocorreu um aumento da CSA do TFDS do MAD em relação à monitorização anterior, ainda se observa nesse tendão uma região que

apresenta um grau de hipoecogenicidade que permite diferenciar o tecido lesionado do saudável, e o seu padrão longitudinal apresenta perda de linearidade das fibras no mesmo local, indicativa da presença de um tecido ainda frágil. Devido à aproximação de provas desportivas importantes para os proprietários, estes decidiram continuar o trabalho regular

Figura 15 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 2A do membro anterior direito, obtidas através de ecógrafo portátil, 5 semanas após a aplicação de PRP

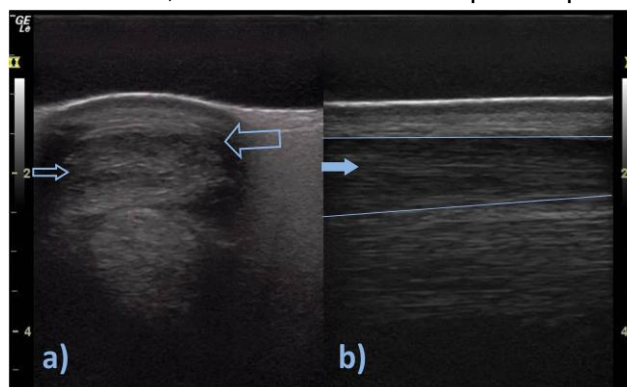


Exame ecográfico de monitorização: a) observa-se uma região hipoecogénica central no TFDS, correspondendo à recidiva da lesão onde foi aplicado o PRP (seta); b) observa-se a ausência de linearidade das fibras na região mais palmar do TFDS. (cedido por *Hippiatrica*)

do animal, descurando as recomendações anteriores do mv. O mv recomendou a mesma terapia anti-inflamatória que indicou no início do caso.

Já depois da época de estágio na clínica *Hippiatrica*, cerca de 12 semanas após cirurgia, o animal sofreu uma nova lesão numa zona mais proximal do mesmo tendão, onde surgiram sinais de inflamação. Esta nova lesão poderá estar relacionada com a anterior devido à sua localização contígua, numa zona mais proximal do TFDS (Figura 16). Segundo o mv, o equino foi submetido ao *splitting* e administração intralesional de PRP cerca de uma semana depois do diagnóstico.

Figura 16 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1A do membro anterior direito, obtidas 12 semanas após a aplicação de PRP



Exame ecográfico de nova lesão: a) observa-se uma lesão irregular do TFDS com áreas hipoecóicas (seta pequena), e uma área anecóica na região mais superficial do tendão (seta grande); b) região anecogénica indicativa de ruptura total das fibras tendinosas, intercalada com região hipoecogénica (seta preenchida). (cedido por *Hippiatrica*)

Caso Clínico 2

Foi presente à consulta um cavalo de raça Oldenburg, macho inteiro de 10 anos, com uma ligeira tumefacção na zona lateral do terço proximal da região flexora do metacarpo do MAE. Esta tumefacção surgiu após a realização de uma prova de saltos de obstáculos e foi prontamente reconhecida pelo tratador. Um dia depois o mv confirmou a existência de sinais inflamatórios nesse local (Figura 17) e procedeu ao exame de claudicação. A única alteração registada neste exame foi dor aquando da palpação desse local.

Devido ao facto de ser uma lesão muito aguda e de o animal não registar nenhum grau de claudicação, os diagnósticos diferenciais são:

- Edema/hematoma subcutâneo
- Tendinite do TFDS;
- Tendinite do TFDP;
- Desmite do LATFDP;
- Fractura do osso metacárpico rudimentar IV

Figura 17- Ligeira tumefacção na face palmar da região metacárpica do membro anterior esquerdo (à esquerda), observada 1 dia após lesão

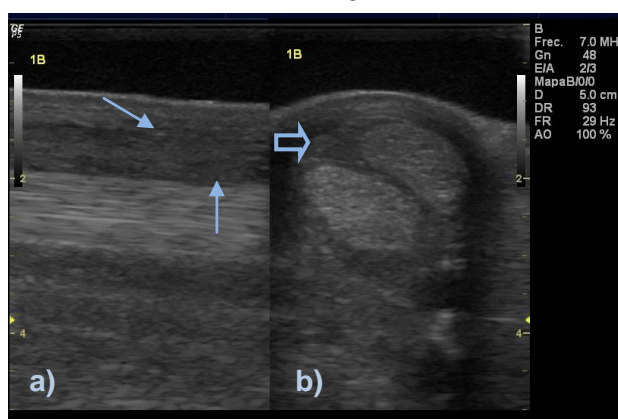


Membro anterior esquerdo foi tosquiado para se proceder ao exame ecográfico da região metacárpica palmar.

Para se obter o diagnóstico definitivo efectuou-se um exame ultrassonográfico. Foi diagnosticada tendinite aguda do TFDS do MAE, porque este apresentava uma lesão excêntrica, ligeiramente hipoeocogénica mas delimitável, que se iniciava na zona 1A mas que tinha maior expressão na zona 1B, onde ocupava cerca de 25% da CSA do tendão (Figura 18). Como se observa na imagem longitudinal (a) da Figura 18, há evidência de um tecido de aspecto amorfo, sem a presença de fibras lineares, indicativo da presença de hematoma.

Esta ultrassonografia foi efectuada muito precocemente, quando ainda existia um hematoma intratendinoso. Ou seja, deve-se repetir o exame apenas a partir do término da fase inflamatória para se poder avaliar a total extensão da lesão. A terapia anti-inflamatória instituída baseou-se na administração de fenilbutazona na concentração de 4,4mg/kg por via endovenosa, duas vezes ao dia durante três dias, e fisioterapia baseada em crioterapia através da aplicação de almofadas de gel durante 15 minutos após o exercício controlado, seguida de massagem da zona afectada e a colocação de ligaduras compressivas compostas por algodão, ligadura coesiva, penso e ligadura de tecido externamente, repetindo todo o procedimento duas vezes ao dia durante cinco dias.

Figura 18 - Imagem ecográfica longitudinal (a) e transversal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas no dia do diagnóstico, com as constantes utilizadas



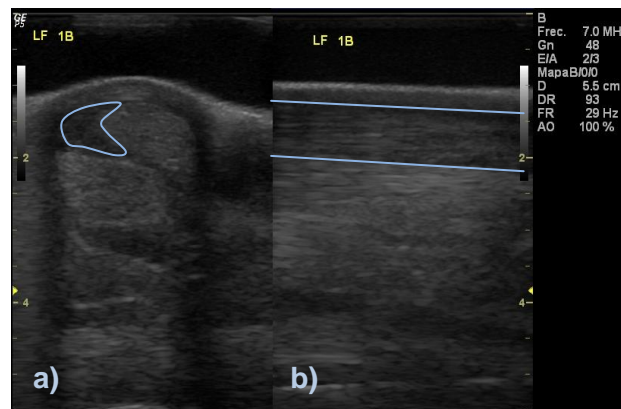
Exame ecográfico de diagnóstico: **a)** as setas apontam para uma região hipoecogénica, sem padrão linear e com aspecto homogéneo ao nível do TFDS, consistente com um hematoma intratendinoso; **b)** observa-se uma lesão excêntrica no TFDS (seta maior), bem delimitada e um pouco hipoecogénica, que ocupa cerca de 25% da CSA do tendão (cedido por *Hippiatrica*).

Cinco dias após o diagnóstico, o animal foi sujeito ao *splitting* ecoguiado do TFDS para drenar os exsudados inflamatórios celulares de modo a que não ocorresse a progressão lesional. Como o processo inflamatório ainda não estava terminado ao fim de seis dias da ocorrência da lesão, não seria correcto administrar o PRP nesta mesma ocasião.

Antes da cirurgia foi executado um novo exame ecográfico (Figura 19), onde se verificou a existência de uma zona anecogénica, que no exame anterior se apresentava hipoecogénica. Como podemos observar na projecção ecográfica longitudinal representada na Figura 19, já não se encontrava presente no TFDS a região homogénea não linear, observando-se pequenas linhas entrecortadas ecogénicas intercaladas com zonas hipo e até anecogénicas. A cirurgia foi executada com o animal sob o efeito de anestesia geral, em decúbito lateral direito, e a lesão foi alvo de múltiplas incisões com acompanhamento ultrassonográfico. O membro foi envolto em ligadura compressiva composta por compressas estéreis a cobrir as soluções de continuidade da pele, cobertas por três voltas de algodão e, por fim, a ligadura coesiva. Após o procedimento, o animal foi medicado com fenilbutazona na concentração de 4,4 mg/kg, por via endovenosa, duas vezes ao dia durante três dias, e para a prevenção de

infecção nos locais da incisão foi administrada cefquinoma na dose de 1 mg/kg por via intramuscular, juntamente com gentamicina na dose de 6,6 mg/kg por via endovenosa, ambas administradas uma vez ao dia durante cinco dias.

Figura 19 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas 5 dias após o diagnóstico, com as respectivas constantes



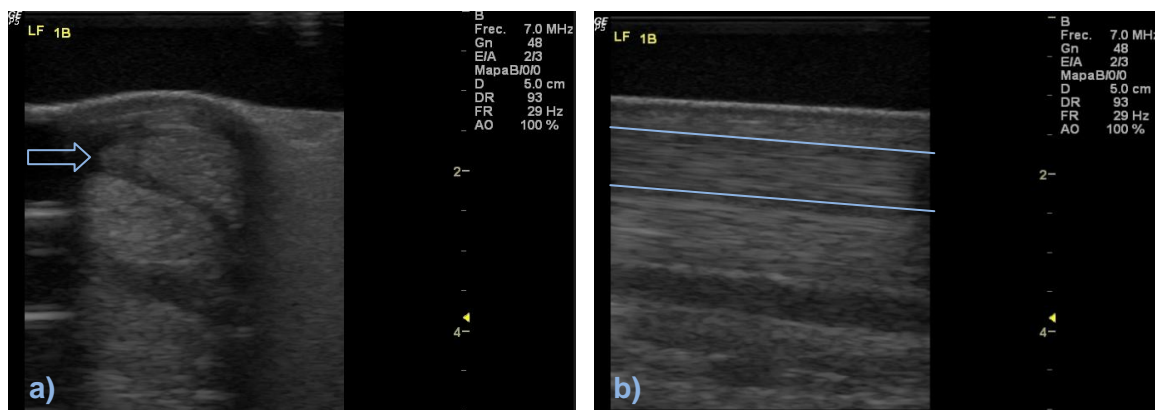
Exame ecográfico antes do *splitting*: **a)** a lesão excêntrica no TFDS corresponde à área anecogénica delimitada, que ocupa cerca de 25% da CSA do tendão; **b)** no TFDS observando-se pequenas linhas ecogénicas entrecortadas, intercaladas com zonas hipo e até anecogénicas (cedido por *Hippiatrica*). **Nota:** a imagem longitudinal foi obtida colocando a sonda ecográfica apenas sobre a área lesionada.

Depois de quatro dias da realização do *splitting* percutâneo ecoguiado (dez dias após o início da lesão), realizou-se a aplicação de PRP. A administração intralesional de PRP foi executada com o animal em estação, sedado com a administração de xilazina (0,3 mg/kg) e butorfanol (0,02 mg/kg) por via endovenosa, e sempre com acompanhamento ultrassonográfico. O membro foi coberto com a ligadura compressiva, e não foi instituída nenhuma medicação, sendo apenas posteriormente executada fisioterapia.

Iniciou-se o protocolo de reabilitação no dia seguinte com caminhadas a passo à mão durante 15 minutos, duas vezes ao dia. Após uma semana e meia de exercício, foi realizado o primeiro exame ultrassonográfico de monitorização (Figura 20), que demonstrou uma óptima evolução da lesão. Na zona 1B esta tinha uma aparência menor, com um aumento da ecogenicidade em relação à encontrada no dia do *splitting*, e já se observava um padrão linear na imagem longitudinal.

Depois de uma semana e meia de exercício controlado na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center*, o equino teve alta e foi posteriormente para o seu país de origem. Foram feitas recomendações do Dr. Manuel Torrealba ao mv que o iria acompanhar, nomeadamente a realização de exames ultrassonográficos de seguimento a cada quatro semanas, e a administração de um suplemento de GAGPS composto por sete doses de 500mg desta substância administradas pela via intramuscular, a cada quatro dias.

Figura 20 - Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 1B do membro anterior esquerdo, obtidas 9 dias após a aplicação de PRP, com as respectivas constantes



Exame ecográfico de monitorização: **a)** a lesão no TFDS encontra-se ligeiramente hipoeecogénica e ainda delimitável, ocupando cerca de 20% da CSA do tendão; **b)** observa-se um padrão linear um pouco menos denso que o normal (cedido por *Hippiatrica*).

Caso Clínico 3

Uma égua de raça Sela Francês, com 16 anos de idade, utilizada em saltos de obstáculos, foi presente à consulta porque o cavaleiro relatou que esta começou a trabalhar de um modo muito irregular. O animal já tinha um historial anterior de desmiste do ligamento sesamoideo oblíquo medial do MAE, já resolvida, mas que obrigou à sua permanência com ferraduras fechadas (*Egg Bar*), representadas na Figura 21.

Figura 21 – Ferração fechada nos membros anteriores com deposição de silicone na zona dos talões



O MAD (direita) apresenta os talões mais fechados em relação ao MAE, ou seja, apresenta talões contraídos, o que resulta num aumento da pressão no interior do casco, principalmente a nível das cartilagens alares que se vão projectar proximalmente.

O exame de claudicação estático efectuado não apresentou quaisquer alterações. No exame dinâmico em ambos os pisos, mole e duro, o animal apresentou a trote um grau de

claudicação 3/5 do MAD, e em círculo, tanto para a mão esquerda como para a direita, um grau de claudicação de 4/5. Não foi observado a galope porque já se tinha evidenciado a claudicação e, principalmente, para não exacerbar qualquer lesão presente (por exemplo uma fractura). De seguida revelou-se a positividade ao teste de flexão do boleto do MAD através de fortes indícios de dor, identificados pela reacção do animal. De modo a identificar a zona envolvida na sintomatologia, foram realizados bloqueios perineurais, sempre da zona mais distal para a mais proximal. O bloqueio digital palmar resultou negativo, seguindo-se o bloqueio abaxial que revelou 80% de positividade. Foi através do bloqueio dos quatro pontos baixos que se aboliu completamente a claudicação, reduzindo-se a origem da dor às estruturas presentes entre o terço distal da região metacarpiana e a região da primeira falange do MAD.

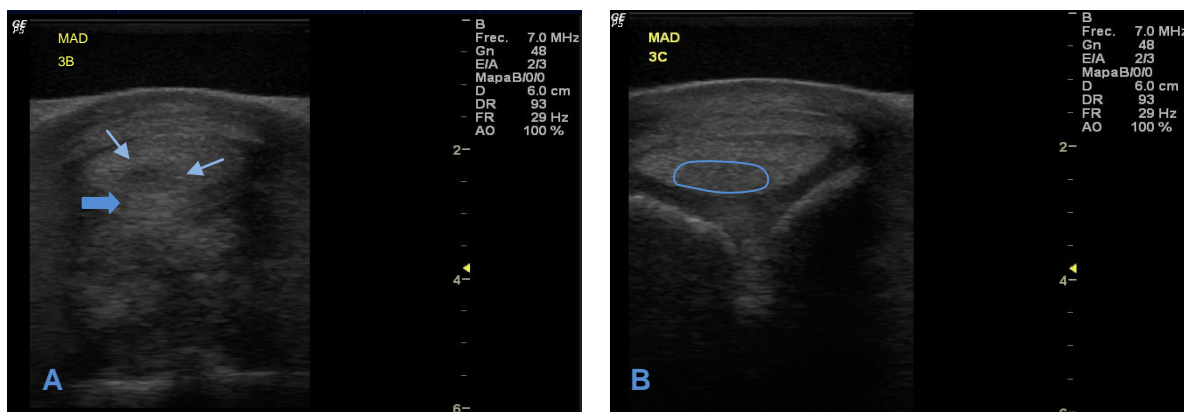
Neste momento os possíveis diagnósticos diferenciais são:

- Osteoartrite na articulação metacarpofalângica/interfalângica proximal;
- Artrite aguda da articulação metacarpofalângica/interfalângica proximal;
- Tendinite dos ramos do TFDS a nível da quartela;
- Desmite dos ligamentos sesamoideus oblíquos;
- Fissura/fractura da terceira falange;
- Fissura/fractura da primeira/segunda falange/sesamóides proximais;
- Tendinite do tendão extensor lateral/tendão extensor comum;
- Tendinite do TFDP a nível do boleto e/ou quartela;
- Desmite do ligamento sesamoideu recto;
- Desmite dos ligamentos colaterais da articulação metacarpofalângica ou da articulação interfalângica proximal.

Entretanto a égua foi medicada com fenilbutazona na dose de 2,2 mg/kg, por via oral, duas vezes ao dia durante três dias, e foi recomendada a utilização permanente de ligaduras de suporte um pouco abaixo do boleto do MAD.

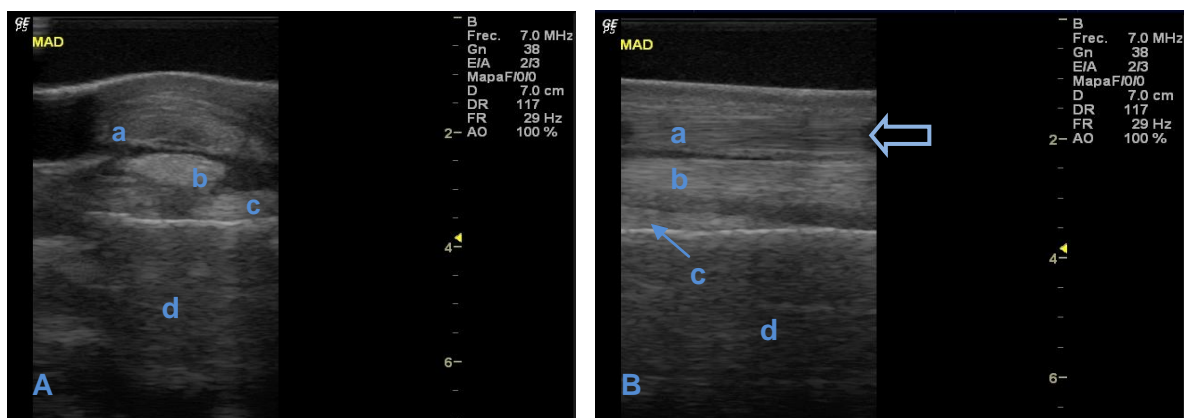
Quatro dias depois dos bloqueios perineurais realizou-se uma avaliação radiográfica da região distal do membro. Mais concretamente, realizaram-se seis projecções, duas projecções à região da terceira falange, uma lateromedial e outra dorsopalmar, e quatro projecções à região da articulação metacarpofalângica (boleto), uma dorsopalmar, uma lateromedial, e duas oblíquas (interna e externa). O exame radiográfico não demonstrou nenhuma alteração óssea, sendo inconclusivo no caso de lesões de tecidos moles. De seguida foi feita uma avaliação ecográfica que, por sua vez, revelou a existência de uma lesão central no TFDP com início na zona 3B (região da *manica flexoria*), como demonstrado na Figura 22, e término na zona da falange proximal, concomitante com uma lesão no ligamento sesamoideu oblíquo lateral (Figura 23). Deste modo foi diagnosticada uma tendinite aguda do TFDP com concomitante desmite do ligamento sesamoideu oblíquo lateral, mas desconhece-se se esta tem carácter agudo ou crónico.

Figura 22 – Imagens ecográficas transversais da zona 3B (A) e 3C (B) do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as respectivas constantes



Exame ecográfico de diagnóstico: **A** – na zona 3B denota-se uma zona anecogénica no interior do TFDP correspondente a uma *core lesion* (setas finas), e um espessamento da *manica flexoria*, indicada pela seta larga; **B** – na zona 3C observa-se a superfície palmar dos sesamóides proximais, e está delimitada uma ligeira hipoeecogenicidade na região mais dorsal do TFDP (cedido por *Hippiatrica*).

Figura 23 – Imagem ecográfica transversal (A) e longitudinal (B) da zona palmar da falange proximal do membro anterior direito, obtidas no dia do diagnóstico, com as respectivas constantes



Legenda: **a** - tendão flexor digital profundo (TFDP); **b** – ligamento sesamoideu recto; **c** – ligamento sesamoideu oblíquo; **d** – primeira falange.

Exame ecográfico de diagnóstico: **A** - denota-se uma zona hipoeecogénica na superfície dorsal do TFDP, e a ausência da demarcação das margens do ligamento sesamoideu oblíquo lateral com desorganização na sua estrutura, aumento da sua CSA e ecogenicidade diminuída, comparativamente ao ligamento medial; **B** - observa-se um padrão longitudinal desorganizado e mais hipoeecogénico na região distal do TFDP, indicado pela seta grossa (cedido por *Hippiatrica*).

O animal foi internado logo após o diagnóstico onde se procedeu ao manejo da fase inflamatória da tendinite, basicamente através de fisioterapia. Esta englobava exercício controlado iniciado com o caminhar da égua a passo, à mão, durante 15 minutos duas vezes ao dia, sempre seguido de períodos de 15 minutos de crioterapia e posterior massagem intensa do boleto e da quartela do MAD, finalizando-se todo este procedimento com a colocação de ligadura de suporte do boleto.

A cirurgia foi executada seis dias após o diagnóstico definitivo. Para se proceder ao *splitting* percutâneo ecoguiado e administração intralesional de PRP no TFDP e no ligamento

sesamoideu oblíquo lateral, o animal foi colocado em decúbito lateral direito sob o efeito de anestesia fixa. No final da cirurgia foi colocada uma ligadura compressiva desde o terço inferior da canela até cobrir os talões e a parede do casco, composta por compressas estéreis a cobrir o local das incisões, cobertas por três voltas de algodão hidrófilo e ligadura coesiva externamente. Foi instituído o plano de medicação que incluía a administração do anti-inflamatório não esteróide fenilbutazona na dose de 4,4 mg/kg, por via endovenosa, duas vezes ao dia durante três dias, e a administração profiláctica de cefquinoma na dose de 1mg/kg, via intramuscular, e gentamicina na dose de 6,6 mg/kg, por via endovenosa, ambas uma vez ao dia durante cinco dias. A mudança de penso realizou-se a cada dois dias, com a consequente antisepsia das soluções de continuidade, procedendo-se à sua remoção definitiva sete dias após a cirurgia. Foi instituído um protocolo de reabilitação o qual foi acompanhado na clínica até uma semana após a cirurgia, período após o qual o animal recebeu alta e foi encaminhado para os proprietários.

Devido a problemas técnicos com o ecógrafo portátil, perderam-se as imagens ecográficas de controlo guardadas no aparelho. Sabe-se que a lesão do TFDP ficou preenchida e com relativamente boa ecogenicidade ao fim de 8 semanas, e que o ligamento sesamoideu oblíquo lateral se encontrava semelhante, em termos de forma e ecogenicidade, ao ligamento medial. Após 3 meses da intervenção cirúrgica o animal executou provas de saltos de obstáculos com sucesso, e não sofreu recidiva lesional.

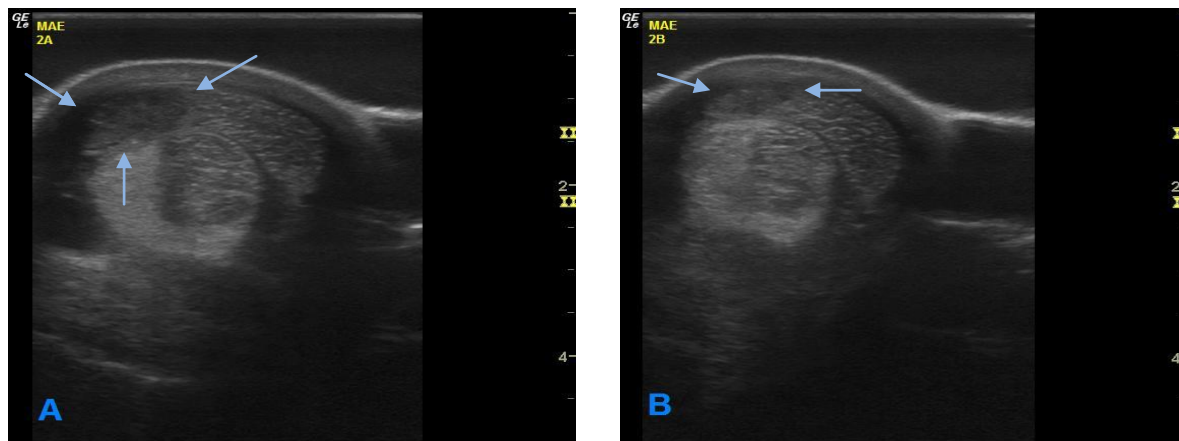
Caso Clínico 4

Foi referenciado para a clínica *Hippiatrica Equine Medical Center* o caso de um equino macho castrado, de raça Cruzado Português com 13 anos, utilizado em provas de obstáculos, que possuía historial de tendinite do TFDS já na fase crónica. Segundo o seu mv, o animal sofreu uma lesão no TFDS, tendo o estímulo iatrogénico sido uma tumefacção na região palmar da canela (metacarpo) do MAE que surgiu após uma prova desportiva. No exame de claudicação dinâmico a trote em linha recta, no piso duro, apresentava um grau de claudicação 2/5, enquanto no piso mole em círculo para a direita, possuía grau 3/5. A tendinite foi posteriormente diagnosticada através de ultrassonografia onde se verificou a presença de uma lesão no TFDS com início na zona 2A e término na região 2B. Nessa altura o animal fez terapia anti-inflamatória durante dez dias, permanecendo em repouso absoluto durante um mês, sendo depois colocado a campo num *paddock*.

Dois meses depois da permanência do animal a campo, foi executado um novo exame físico onde se observaram sinais inflamatórios evidentes, principalmente a tumefacção. Foi também efectuado um exame ecográfico de seguimento onde se verificou que a lesão permanecia sem alterações (Figura 24 e 25). O caso foi então referenciado para o

orientador para a realização de *splitting* percutâneo ecoguiado e administração intralesional de PRP.

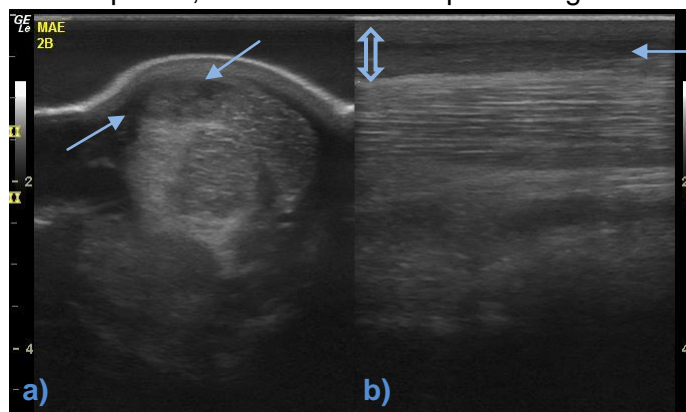
Figura 24 – Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A) e da zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 3 meses após o diagnóstico inicial



Exame ecográfico de monitorização: **A** – lesão excêntrica no TFDS indicada pelas setas, caracterizada pela presença de uma área hipoeecogénica que ocupa cerca de 40% da CSA do tendão na zona 2A; **B** – na zona 2B observa-se a mesma lesão que em A (setas), mas com menor CSA (cedido pelo Dr. João Borges).

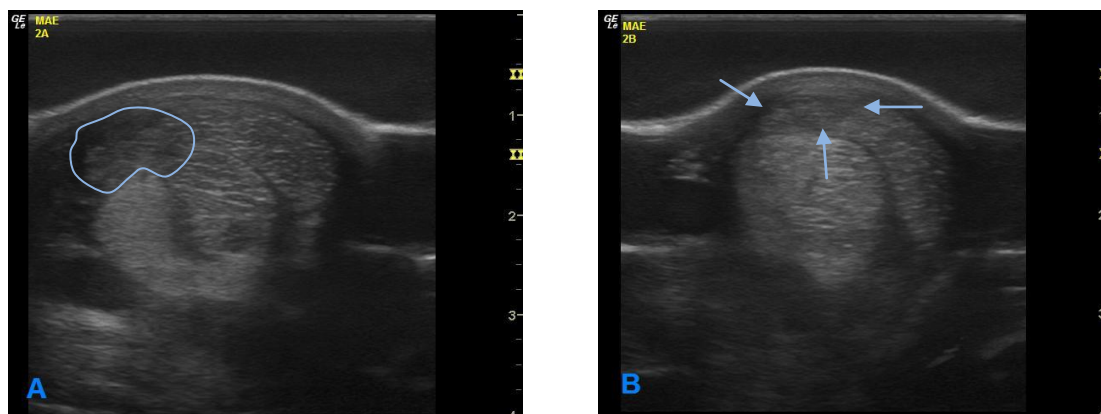
A cirurgia foi então efectuada três meses depois da lesão inicial do TFDS. O animal foi colocado em decúbito lateral direito sob efeito de anestesia geral fixa, procedendo-se à administração intralesional de PRP no TFDS após a execução do *splitting* percutâneo ecoguiado. No término da cirurgia foi colocada uma ligadura compressiva. A medicação prescrita englobou antibioterapia durante cinco dias, com a administração de penicilina procaína na dose de 22000 UI/kg por via intramuscular, e gentamicina na dose de 6,6 mg/kg por via endovenosa, ambas duas vezes ao dia, e também a terapia anti-inflamatória constituída pela administração de fenilbutazona na concentração de 4,4mg/kg, pela via endovenosa, duas vezes ao dia durante três dias.

Figura 25 – Imagem ecográfica transversal (a) e longitudinal (b) da zona 2B do membro anterior esquerdo, obtidas 3 meses após o diagnóstico inicial



Exame ecográfico de monitorização: **a)** lesão excêntrica no TFDS apresentando um tecido desorganizado com diferentes graus de ecogenicidade (setas finas); **b)** não se observa o padrão longitudinal criado pelas fibras do TFDS (seta larga), e está visível uma região anecogénica no meio do tendão, indicada pela seta fina (cedido pelo Dr. João Borges).

Figura 26 - Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A) e da zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 3 dias após a aplicação de PRP



Exame ecográfico de monitorização: **A** – lesão excêntrica no TFDS, caracterizada pela presença de uma área hipoeecogénica bem delimitada que ocupa cerca de 40% da CSA do tendão na zona 2A; **B** – a mesma lesão (setas) observada na zona 2B, ocupando cerca de 30% da CSA do TFDS nessa zona (cedido pelo Dr. João Borges).

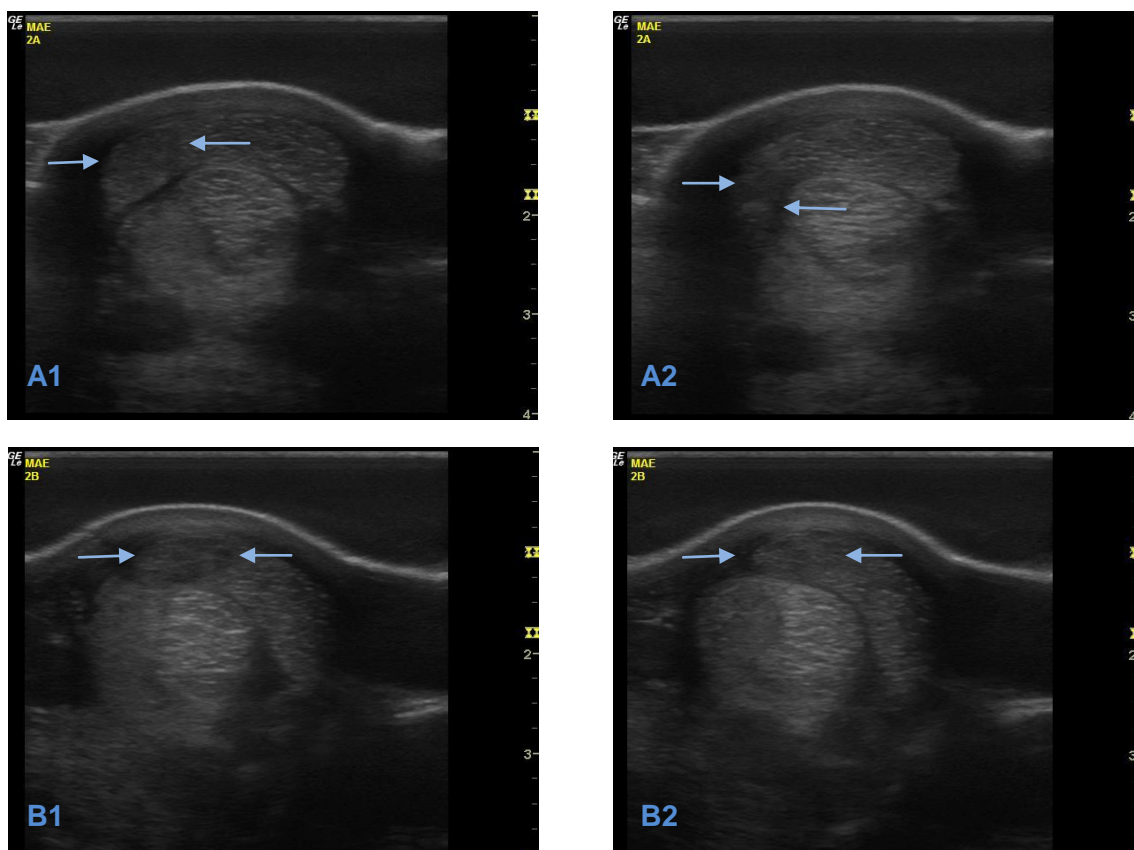
Devido a razões relacionadas com o maneio do equino, este foi mantido em repouso total durante uma semana. No entanto, logo de seguida iniciou o protocolo de reabilitação descrito no Anexo 3.

O mv assistente realizou um exame ecográfico três dias depois da cirurgia, onde já se denotava uma pequena alteração na ecogenicidade a nível da lesão (Figura 26), embora a FAS da mesma permanecesse igual à verificada antes da aplicação de PRP. Foi efectuado novo estudo ecográfico oito dias após a intervenção cirúrgica onde, nas imagens transversais, se verificou um grande aumento na qualidade da reparação do tecido tendinoso, observando-se uma ecogenicidade maior, semelhante à do tecido normal (Figura 27). Mas nas imagens longitudinais do mesmo estudo (Figura 28) observou-se que o tecido em reparação ainda se encontrava bastante hipoeecogénico, e que a FAS do TFDS possuía graduação elevada, correspondendo à existência de um tecido incapaz de suportar as forças de tracção que normalmente ocorrem durante o exercício.

No final do protocolo de exercício controlado, nove semanas após a administração de PRP, foi efectuado outro exame ecográfico pelo mv assistente (Figura 29). Nas imagens transversais já não se encontra presente uma lesão, mas sim um tecido em reparação com ecogenicidade igual ao tecido normal adjacente, em que a distinção entre os tecidos é possível devido à ausência da imagem típica criada pelos fascículos tendinosos normais. Nas imagens longitudinais, observa-se um padrão linear no TFDS evidente na zona 2B, mas não na zona 2A, onde a lesão possuía maior expressão, e onde o tecido ainda se apresenta hipoeecogénico e desorganizado.

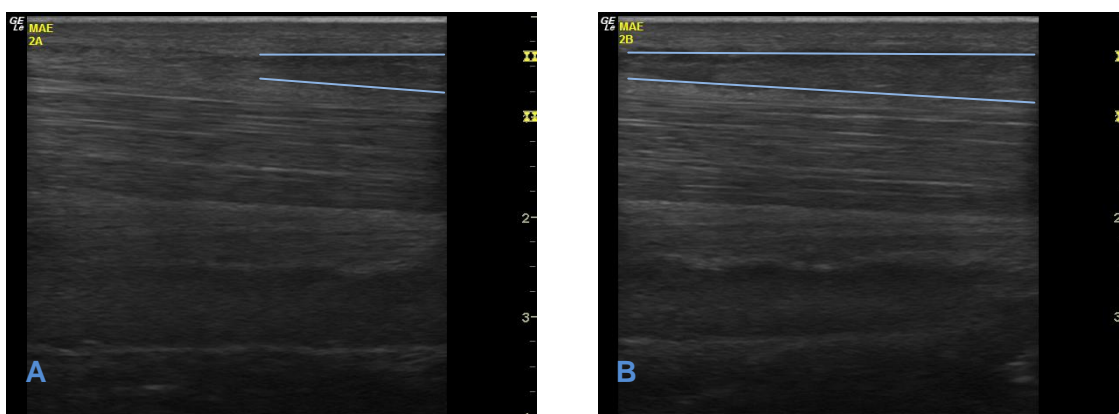
Devido aos achados ecográficos obtidos após o término do protocolo de exercício estabelecido, o mv assistente optou por não colocar o equino em trabalho de saltos regular, permanecendo em exercício controlado por mais um mês, até ao exame ecográfico seguinte.

Figura 27 - Imagens ecográficas transversais da zona 2A (A1 e A2) e da zona 2B (B1 e B2) do membro anterior esquerdo, obtidas 8 dias após a aplicação de PRP



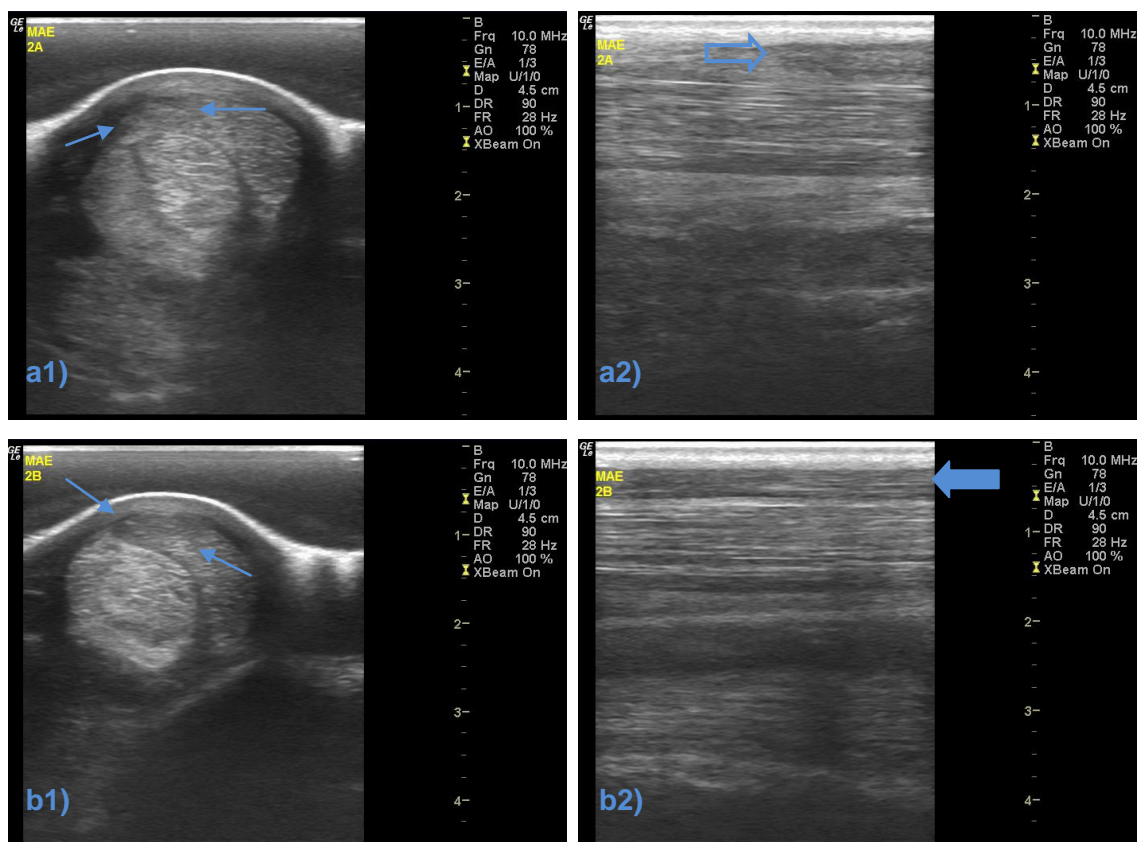
Exame ecográfico de monitorização: **A1** – na zona 2A observa-se uma lesão no TFDS (setas) com características semelhantes ao tecido normal adjacente, visível devido à ausência de fascículos; **A2** – a mesma lesão observada numa região mais distal da zona 2A, apresentando-se mais delimitável e hipoeecogénica (setas); **B1** – observa-se a mesma lesão na zona 2B, com aspecto desorganizado e hipoeecogénico (setas); **B2** – a mesma lesão numa região mais distal da zona 2B (setas) (cedido pelo Dr. João Borges).

Figura 28 - Imagens ecográficas longitudinais da zona 2A (A) e da zona 2B (B) do membro anterior esquerdo, obtidas 8 dias após aplicação de PRP



Exame ecográfico de monitorização: **A** – vista longitudinal da zona 2A, onde se visualiza o início da lesão no TFDS, caracterizada pela hipoeecogenicidade tecidular e ausência do padrão linear; **B** – a mesma lesão ao nível da zona 2B, mas com maior expressão (cedido pelo Dr. João Borges).

Figura 29 - Imagens ecográficas transversais (a1 e b1) e longitudinais (a2 e b2) da zona 2A e da zona 2B do membro anterior esquerdo, obtidas 9 semanas após a aplicação de PRP, com as respectivas constantes



Exame ecográfico de monitorização: **a1)** imagem transversal da zona 2A, onde se observa uma lesão excêntrica do TFDS semelhante ao tecido normal (setas), mas composta por um tecido ainda desorganizado e com bordo irregular; **a2)** imagem longitudinal da zona 2A, onde ainda é visível o início da lesão no TFDS que se apresenta ligeiramente hipocogénica (seta larga), composta por fibras curtas mais ecogénicas; **b1)** imagem transversal da zona 2B representando a extensão da lesão observada em a1 (setas); **b2)** imagem longitudinal da zona 2B demonstrando a extensão da lesão (seta larga) observada em a2 (cedido pelo Dr. João Borges).

Discussão

Os casos clínicos descritos retratam afecções que ocorrem comumente na clínica de equinos de desporto. As afecções descritas englobam principalmente lesões tendinosas, nomeadamente tendinite do TFDS na região metacarpiana e tendinite do TFDP onde este se encontra recoberto pela bainha digital, e uma lesão ligamentosa concomitante a esta última, todas ocorridas a nível dos membros anteriores. A localização das lesões observadas está de acordo com a incidência lesional em equinos de desporto descrita por Smith & Goodship (2004) e Smith (2011). Todas estas lesões receberam terapia com PRP. O prognóstico para a maioria das lesões tendinosas e ligamentosas em equinos de alta competição desportiva, descrito por Jorgensen et al. (2011), Dyson (2011a), Reef e

Genovese (2011), varia de razoável a reservado. No entanto, existem factores que podem melhorar o prognóstico destas afecções em termos do regresso do equino à actividade desportiva. O diagnóstico precoce da tendinite e da desmíte é, sem dúvida alguma, um factor importante para que tal ocorra. Para tal há que instruir os tratadores, cavaleiros e proprietários para os cuidados a ter com os membros dos equinos, antes e depois do trabalho, e alertá-los sobre a importância da identificação atempada da sintomatologia associada às afecções musculoesqueléticas. Nos casos 1 e 2 foi possível diagnosticar prontamente a lesão, evitando posteriores danos na estrutura afectada, devido à rápida denuncia ao mv da presença de tumefacção na região metacárpica.

Segundo Gillis (2004) e Smith (2011), a tendinite do TFDS ocorre essencialmente em animais que se encontram em plena actividade desportiva, cujo trabalho se revela intenso e envolve sobretudo o galope e/ou saltos. Como podemos observar nos casos 1, 2 e 4, os equinos desenvolveram como sinais clínicos tumefacção dolorosa à palpação na região metacarpiana palmar, na zona da lesão, e a maioria apresentou claudicação transitória ligeira a moderada, indo ao encontro da sintomatologia descrita por McIlwraith (2002) e Jorgensen et al. (2011) para estas lesões. Nestes casos não se efectuaram bloqueios perineurais, no caso 2 porque o animal não claudicava, no caso 1 porque o animal tinha um grau de claudicação negligenciável para o efeito. Mas, em geral, não se utilizou porque a tumefacção dolorosa à palpação existente em todos estes casos direccionou o diagnóstico. O diagnóstico diferencial para as lesões na região metacárpica é normalmente limitado ao exame físico, na medida em que o TFDS é facilmente palpável e isolado de estruturas mais profundas. No entanto, uma tumefacção dolorosa na região metacarpiana palmar poderá resultar de uma lesão nas estruturas ósseas subjacentes, tais como os metacarpos acessórios. Os hematomas subcutâneos e as dermatites causadas por picada de insecto ou pelo uso de ligaduras também poderão causar tumefacção, sendo esta dificilmente diferenciada do TFDS, que está imediatamente sob a pele (Dyson, 2011b).

Segundo Gillis (2004) e Dyson (2011a) a tendinite do TFDP é uma afecção geralmente unilateral que surge sobretudo em animais de meia-idade, maioritariamente associada à doença do navicular (podotrocleose) ou a desmíte dos ligamentos sesamoideus distais como sucedeu no caso número 3, onde a tendinite ocorreu concomitantemente a uma desmíte do ligamento sesamoideu oblíquo lateral, que se desconhece ser ou não a razão da sua ocorrência. As lesões no TFDP ocorrem frequentemente ao nível da região do boleto e da quartela, dentro da bainha digital, tal como se observou no caso 3. Segundo Reef e Genovese (2011), as desmites dos ligamentos sesamoideus oblíquos são as mais comuns entre os ligamentos sesamoideus, ocorrendo em animais de todos os tipos de disciplinas equestres. Geralmente são lesões acompanhadas de sinais clínicos de inflamação óbvios na quartela, excepto aquelas que se situam apenas na origem destes ligamentos. Pelo facto de não ter sido descoberta no exame clínico nenhuma sintomatologia associada às

afecções, exceptuando-se a claudicação moderada e persistente de grau 3/5, não foi possível determinar a região do membro envolvida. Deste modo, foi necessário recorrer aos bloqueios perineurais, iniciando-se através do bloqueio dos nervos digitais palmares (lateral e medial), seguido do bloqueio abaxial e de quatro pontos baixos, para abolir a claudicação. A negatividade do bloqueio dos nervos digitais palmares indica que a dor não decorre de doença do navicular, ou de afecções que envolvam estruturas na região palmar do casco. Como 80% da claudicação melhorou após o bloqueio abaxial, não se descartou a possibilidade da existência de afecções que atingissem estruturas dessensibilizadas por esse bloqueio, principalmente aquelas que ocorrem desde a falange média até à falange proximal, tais como as desmites dos ligamentos sesamoideus e dos ligamentos colaterais da articulação interfalângica proximal, a tendinite do TFDS e do TFDP na zona da quartela, a tendinite dos tendões extensores digitais, as afecções da articulação interfalângica proximal e as fracturas ou fissuras na primeira, segunda e terceira falanges. Ao se abolir completamente a claudicação através do bloqueio dos quatro pontos baixos, limitou-se parte da dor resultante de estruturas existentes entre o terço distal da região metacarpiana e daquelas existentes na região da articulação metacarpofalângica. Com os achados obtidos no caso 3, tais como a claudicação persistente de grau 3/5, o bloqueio digital palmar negativo, o bloqueio abaxial parcialmente positivo e o bloqueio dos quatro pontos baixos positivo, pode-se aferir que a dor poderia provir de lesão em duas estruturas anatomicamente distintas, de lesão numa mesma estrutura anatómica que percorre regiões diferentes, ou de lesão numa estrutura enervada por vários ramos nervosos.

Os exames complementares efectuados basearam-se em exames imagiológicos, nomeadamente a radiologia e a ultrassonografia. No caso 3 foi efectuado um estudo radiográfico composto por seis projecções, isto porque não havia sinais clínicos evidentes de lesões de tecidos moles, recaindo as suspeitas principalmente para o envolvimento das articulações metacarpofalângica e interfalângica proximal, seguida da suspeita do envolvimento ósseo por fractura ou fissura nas falanges, porque num equino que pratique a modalidade de obstáculos é normal estas surgirem após quedas e contacto com as barras de salto. O exame radiológico também pode ser utilizado para verificar se existe alguma alteração óssea concomitante a lesões de tecidos moles. Segundo Reef e Genovese (2011), no caso da desmite do ligamento sesamoideu pode ocorrer fractura por avulsão na sua origem e inserção, e nos casos de lesão crónica nestes ligamentos surge instabilidade articular da articulação interfalângica proximal, com a possibilidade de ocorrência de subluxação dorsal. Neste caso, como na radiografia não se identificaram alterações, efectuou-se um exame ecográfico onde se reconheceram as estruturas afectadas, o TFDP e o ligamento sesamoideu oblíquo lateral.

O diagnóstico definitivo das tendinites do TFDS e do TFDP é fornecido através do exame ultrassonográfico. Para o diagnóstico das desmites dos ligamentos sesamoideus pode ser

necessária a utilização de uma técnica imagiológica mais sensível, tal como a ressonância magnética, pois existem alterações nestes ligamentos que não são perceptíveis à ultrassonografia, principalmente se estas se apresentarem na sua origem. No caso clínico 3 protelou-se o exame ecográfico por quatro dias, porque após a infiltração do anestésico para bloqueios perineurais, ocorre edema local que provoca artefactos e erros de interpretação durante o exame ecográfico. No caso 2 e 4 foi diagnosticada tendinite do TFDS com a presença de lesões excêntricas no tendão, reflexo de um evento único que desencadeou uma força de tracção superior à força tênsil de um determinado conjunto de fibras tendinosas, levando à sua ruptura. No caso 1 e 3 foram observadas lesões centrais agudas nos tendões flexores digitais superficial e profundo, respectivamente, que de acordo com Smith e Goodship (2004), Dahlgren (2007) e Smith (2011), são resultado de prévia degenerescência do tecido tendinoso provocada por microlesões repetidas que, por fim, culminam numa lesão com significado clínico. No caso 1 deveria ter sido efectuado um estudo ultrassonográfico completo ao membro contralateral para despiste de lesão ou alterações, porque a degenerescência tecidular tende a ocorrer bilateralmente (Smith, 2011). No caso 3, a desmite do ligamento sesamoideu oblíquo identificada à ultrassonografia apresentava algumas características de lesão aguda, tais como a desorganização da estrutura do ligamento, perda do seu contorno e a perda difusa de ecogenicidade do tecido à imagem transversal e longitudinal. Não existiam indícios de cronicidade nesta lesão, como a presença de tecido hiperecogénico, de focos de calcificação intrínseca e de entesiófitos na zona de inserção ou/e de origem do ligamento, como está descrito por Reef e Genovese (2011). Para identificar possíveis alterações na bainha sinovial digital poderia ter sido efectuada uma sinoviocentese para identificar indícios de inflamação, ou uma ressonância magnética para verificar a possibilidade da existência de aderências entre a bainha e o TFDP que predis põem este tendão a lesão (Dyson, 2011a).

O tratamento inicial foi idêntico em todos os casos apresentados. Trata-se de uma terapia anti-inflamatória aplicada nos primeiros dias da lesão para limitar os efeitos nefastos da inflamação no tecido tendinoso ou ligamentoso, comumente descrita na literatura (Dowling et al., 2000; McIlwraith, 2002; Jorgensen et al., 2011). No entanto, existem outros tratamentos ditos coadjuvantes que poderiam beneficiar a acção anti-inflamatória do tratamento prescrito e a reparação subsequente da estrutura lesionada. Esses tratamentos estão descritos no capítulo 2.4, e englobam a administração intralesional de AH e a administração sistémica de GAGPS. No caso 3 poderia ter sido executada a administração intra-sinovial de AH na bainha digital para diminuir o risco de adesões entre a região dorsal do TFDP e o folheto visceral da bainha.

O Dr. Manuel Torrealba defende a utilização do *splitting* cirúrgico ecoguiado em lesões tendinosas e ligamentosas, tanto crónicas como agudas, como medida terapêutica associada ao PRP. Nas lesões agudas é útil para descomprimir áreas repletas de edema e

exsudados inflamatórios, e até de sangue provindo de hemorragia dos vasos do endotendão, diminuindo o dano que seria posteriormente causado nas fibras tendinosas saudáveis adjacentes. No entanto, a utilização desta técnica em lesões crónicas encontra-se muito pouco descrita na literatura, pois foi anteriormente abandonada por provocar maior produção de tecido de granulação. Por isso, a técnica de *splitting* nas lesões crónicas é efectuada apenas em junção com o PRP, porque além de facilitar a injeção deste composto, cria canais e estimula a revascularização do tecido cicatricial de modo a permitir a entrada de células reparadoras e MSCs, atraídas pelos FC presentes no PRP depositado. A utilização da técnica de *splitting* obriga à anestesia geral para evitar quaisquer acidentes advindos da movimentação do equino, que poderiam provocar a incisão acidental do tendão, pois trata-se de uma técnica que provoca dor. Após esta cirurgia é necessária uma ligadura compressiva para isolar o local da incisão, ajudar na drenagem de exsudados e diminuir o edema dos tecidos. Mesmo sendo uma técnica cirúrgica efectuada de modo estritamente asséptico, a antibioterapia profilática de largo espectro foi instituída devido ao elevado valor dos animais e tendo em conta as consequências de uma tendinite séptica. Foi também administrada terapia anti-inflamatória para diminuir a formação de edema nos tecidos intervencionados e como forma de providenciar bem-estar ao animal, aliviando a dor pós-cirúrgica. Para promover suporte às estruturas intervencionadas durante a recuperação, os animais poderiam ter sido ferrados nos membros anteriores com ferraduras fechadas ou com ferraduras com extensões dos ramos.

A terapia regenerativa com PRP envolveu uma técnica manual bastante simples e facilmente exequível, sendo a administração sempre ecoguiada para que fosse aplicado exactamente no local da lesão. No caso 2, a terapia com PRP foi efectuada quatro dias após o *splitting*, porque a lesão ainda se encontrava na fase inflamatória. Se aplicássemos o PRP nesta fase ocorria, muito certamente, a fagocitose das plaquetas e a destruição dos FC pelas enzimas proteolíticas libertadas pelos leucócitos presentes no local, diminuindo a acção terapêutica do composto. De acordo com Ramirez (2006), a aplicação do PRP no início da fase fibroblástica seria o ideal, antes da produção de tecido de granulação, porque é quando se tira mais partido da aceleração do processo de reparação através dos efeitos quimiotáctico, angiogénico e mitogénico desta terapia. Este objectivo foi conseguido nos casos 2 e 3. No entanto, nos casos 1 e 4 a aplicação do PRP foi tardia, sendo executada no fim da fase fibroblástica e no início da fase de remodelação, ou seja, quando já se deu a maior parte da produção de colagénio e outros componentes da MEC. Isto não significa que a terapia não produza efeitos regeneradores, no entanto, talvez pudessem ter sido alcançados melhores resultados em ambos estes casos com uma administração de PRP mais precoce. Penso que a solução terapêutica ideal para a tendinite do TFDS descrita no caso 1 se basearia na aplicação de MSCs em conjunto com o PRP, tal como descreve

Ramírez (2006), visto ser uma lesão resultante da degenerescência das fibras tendinosas e dos tenócitos centrais.

O protocolo de reabilitação utilizado teve como base a vasta experiência do Dr. Manuel Torrealba. É um protocolo de curta duração que se tem revelado relativamente eficaz porque permite uma maior colaboração do proprietário. Como se verificou em todos os casos, por opção do Dr. Manuel Torrealba, os animais foram sempre aconselhados a fazer caminhadas à mão progressivamente mais longas, porque ele considera que o confinamento do animal deve ser acompanhado de caminhadas à mão, iniciadas logo após o diagnóstico, à excepção dos casos em que está iminente a ruptura total do tendão. As caminhadas à mão não devem ser proteladas porque constituem uma parte importante do tratamento. Como se verificou no caso 4, a colocação do animal num *paddock* grande é adversa à sua recuperação (Jorgensen et al., 2011), devido ao comportamento normal dos equinos, tendo de facto, neste caso, resultado na recidiva lesional. Também muito importante para a recuperação de uma lesão tendinosa ou ligamentosa do equino é transmitir e dar a entender a importância deste protocolo ao proprietário do animal, pois um elevado nível de comprometimento da sua parte constitui um passo importantíssimo para o sucesso de qualquer terapia. Mesmo com a aplicação de terapias que acelerem todo o processo de reparação dos tecidos tendinosos e ligamentosos, é absolutamente imperativa a execução passo a passo de um protocolo de reabilitação física elaborado especificamente para cada caso. Há que advertir os proprietários para a realidade de que não existem curas milagrosas para estas afecções, e que embora sejam necessários menores períodos de afastamento da actividade desportiva após a terapia com PRP, estes continuam a possuir igual importância para a recuperação do desempenho desportivo do equino. As lesões tendinosas e ligamentosas são limitantes para a actividade física do equino porque provocam deterioração do seu desempenho e, caso o animal não seja tratado, podem culminar na sua inutilização permanente em termos desportivos. No caso da desmíte do ligamento oblíquo lateral, poderá ocorrer até a subluxação dorsal da articulação interfalângica proximal, com prognóstico reservado segundo Reef e Genovese (2011). Mas as exigências dos proprietários, que residem na recuperação rápida e pouco dispendiosa do animal, ditam muitas vezes a forma como é seguido o tratamento, como aconteceu no caso 1. Por vezes, mesmo estando perante um equino de elevado valor, e sendo os proprietários aconselhados e postos a par pelo mv dos riscos de manter o animal em trabalho, estes descuidam a saúde do cavalo em prol da sua presença em provas de competição.

Como podemos verificar no caso 4, a ultrassonografia de acompanhamento foi crucial para o mv verificar, através de uma FAS pouco satisfatória, que a estrutura envolvida ainda não se encontrava pronta para suportar as tensões do trabalho normal. No caso 1, através do acompanhamento ultrassonográfico executado 4 semanas após a terapia, verificou-se que a lesão terá recidivado, resultado da má execução do protocolo de reabilitação. No caso 3 o

acompanhamento foi determinante para permitir a colocação da égua em trabalho regular. Os intervalos entre estes exames de seguimento foram regulados de acordo com o avanço do nível de exercício, indo de encontro aos intervalos propostos por Gillis (2007), Fortier (2009) e Rantanen et al. (2011), e revelaram-se suficientes para monitorizar a lesão de forma a evitar recidivas.

Os casos apresentados não demonstraram evidências conclusivas acerca das propriedades regenerativas do PRP, são apenas casos meramente representativos da sua utilização na prática comum de medicina desportiva de equinos, em ambiente clínico. Estes casos reflectem uma terapia que representa uma forma de diminuir a frustração do mv em lidar com as lesões tendinosas e ligamentosas. Nos casos 2 e 4 foram constatadas melhorias concretas das lesões apenas dias após a administração do PRP, indo de encontro aos resultados obtidos por Ramírez (2006), e revelando a capacidade desta terapia em acelerar a reparação tecidular, mesmo em lesões crónicas e recidivantes, como no caso 4. No caso 3, as melhorias constatadas pelo mv tanto a nível do TFDP como do ligamento sesamoideu oblíquo do MAD permitiram ao animal regressar ao trabalho normal oito semanas após o tratamento, regressando à competição três meses após o mesmo. Estes períodos de recuperação são muito menores que aqueles referidos por, Gillis (2004), Dyson (2011a) e Jorgensen et al. (2011) para lesões tendinosas, e por Reef e Genovese (2011) para lesões ligamentosas. À excepção do caso 1, nenhum dos animais sofreu recidiva lesional ou nova lesão à data da execução deste trabalho. Estes dados vão ao encontro dos resultados obtidos por Ramírez (2006), Abellanet e Prades (2009b), que referiram a ocorrência de recidiva lesional após a terapia com de PRP sobretudo em animais com afecções tendinosas crónicas. No entanto, o real valor terapêutico do PRP não foi constatado, porque seriam necessárias documentações ultrassonográficas, que não puderam ser elaboradas, e a avaliação de um número mais representativo de casos clínicos. Os dados ultrassonográficos concretos e objectivos sobre as lesões e as estruturas envolvidas são essenciais para a creditação do sucesso terapêutico desta terapia, mas a maioria dos mv realiza apenas um exame sucinto de diagnóstico, com dados insuficientes para caracterizar a lesão e o progresso da reparação.

IV. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Devido à elevada especialização dos tendões e ligamentos da extremidade distal dos membros dos equinos, estes possuem uma diminuta margem de segurança biomecânica que conduz à elevada incidência de lesões. Sabe-se que as lesões tendinosas e ligamentosas podem colocar em causa o desempenho desportivo do equino, resultando na sua reforma precoce. Depois de uma intensa revisão da literatura, incluindo Smith e

Goodship (2004), Dowling e Dart (2005), Sharma e Maffulli (2005), Dahlgren (2007), Kane e Firth (2009), Smith (2011), entre outros, concluí que existem várias teorias sobre os mecanismos de lesão tendinosa e ligamentosa, mas ainda se desconhece a causa exacta do seu acontecimento. A reparação que se segue é lenta e inadequada, resultando geralmente na formação de um tecido com propriedades estruturais, organizacionais e biomecânicas inferiores ao tecido normal, predispondo a estrutura a recorrência lesional. Os tratamentos convencionais não correspondem às expectativas de mv e proprietários, e não são muitos os estudos que comprovam a sua eficácia terapêutica. Quanto maior for a percepção sobre os acontecimentos envolvidos na lesão e na reparação destas estruturas, maior será a capacidade de desenvolver tratamentos cada vez mais eficazes.

A maioria das afecções tendinosas e ligamentosas possui carácter crónico, devido à fraca capacidade de reparação e à progressiva degenerescência da MEC dos tendões e ligamentos. A degenerescência inicia-se com a interrupção da homeostase que existe entre os processos catabólicos e anabólicos no tecido saudável, culminando numa cascata de eventos moleculares que enfraquecem o tecido. Os factores degenerativos enumerados no trabalho são o stress mecânico, a idade, a taxa de exercício, o diminuto fluxo sanguíneo local e a baixa taxa metabólica destas estruturas. Conclui-se que o avanço da taxa de degenerescência dos tendões e ligamentos é uma consequência inevitável do desporto.

Todos estes factos sobre as lesões tendinosas e ligamentosas levaram ao desenvolvimento de terapias regenerativas inovadoras. A aplicação destas terapias tem como objectivo restaurar a estrutura e a função normal dos tecidos lesionados, acelerar os processos de reparação, restaurar a actividade física e evitar a recorrência lesional. Para a compreensão dos seus princípios foi necessário compreender os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e celulares inerentes ao processo de reparação dos tendões e ligamentos. O PRP constitui uma terapia regenerativa segura e natural, baseada na concentração de plaquetas e FC a partir de uma fracção de sangue autólogo. Os FC presentes no PRP são segregados pelos grânulos α das plaquetas após uma lesão, sendo o TGF- β , o IGF-1, o PDF, o FGF, o VEGF e o EGF os mais referenciados na literatura médico-veterinária. A actuação sinérgica desta combinação fisiológica de proteínas sinalizadoras resulta na promoção da regeneração tecidular através da regulação do metabolismo celular. Devido à simplicidade dos princípios básicos da terapia com PRP, a sua utilização clínica tornou-se realidade mesmo antes da pesquisa da sua eficácia. É uma terapia versátil que pode ser conjugada com outras terapias, que possivelmente poderão amplificar o seu poder regenerativo. Destas terapias, a principal será o *splitting* cirúrgico, que para alguns mv é considerado um passo essencial à terapia com PRP. Outras possibilidades enquadram a administração concomitante de MSCs para incluir, além de FC e matriz, uma população celular potencialmente regeneradora. Actualmente já existem várias evidências clínicas e experimentais que viabilizam a utilização da terapia com PRP em lesões musculoesqueléticas, mas são poucos os estudos clínicos

que comprovam as potencialidades terapêuticas desta terapia nas lesões tendinosas e ligamentosas.

O PRP pode ser obtido através dos métodos de aférese e de centrifugação, manual ou automática. Neste momento, existem muitos sistemas de produção de PRP ao alcance do mv e todos apresentam vantagens e desvantagens, mas os métodos de centrifugação são os mais utilizados em MV por serem menos dispendiosos. Até este momento, ainda não se encontra definido um intervalo óptimo para a concentração plaquetária que deverá estar presente no PRP. Sabe-se apenas que uma dada preparação deve possuir pelo menos quatro vezes o valor fisiológico de plaquetas para possuir os efeitos terapêuticos que definem esta terapia, desconhecendo-se o significado da concentração máxima obtida através de alguns dos sistemas comercializados e até que ponto este facto poderá constituir uma vantagem entre os mesmos. Outro problema encontrado na caracterização desta terapia é o facto de ainda não existir uma definição clara da composição celular e molecular do PRP. O PRP pode conter diversas concentrações dos vários elementos figurados sanguíneos, causando discórdia e confusão na interpretação de diferentes estudos, e reafirmando a ideia de que devem ser determinados limites padrão para as concentrações dos diferentes constituintes, de modo a possibilitar a denominação de uma determinada preparação como PRP. Devido à presente incoerência sobre as características técnicas desta terapia, não existem protocolos de preparação nem de administração universais e padronizados. A utilização de um protocolo diferente ou a ocultação do protocolo utilizado, assim como a ocultação da formulação e da composição do PRP, tem tornado muito difícil e até inviabilizado a comparação entre resultados de diversos estudos e ensaios clínicos existentes sobre a matéria. No entanto, já existem estudos sobre a utilização da terapia com PRP em equinos, tais como os de Araújo et al. (2009), Júnior et al. (2009), Carmona et al. (2007) e Prades (2007), que se centralizaram num protocolo que surge repetidamente na literatura sobre o assunto, nomeadamente, o protocolo indicado por Ramírez (2006).

O protocolo de reabilitação é um elemento essencial na recuperação da função atlética do equino. Existem vários protocolos, variando de acordo com a finalidade desportiva do equino, mas, em termos gerais, possuem todos o mesmo princípio básico. No caso da terapia com PRP ainda não foi formulado um protocolo adaptado ao encurtamento das diversas fases da reparação dos tecidos tendinosos e ligamentosos, sendo necessário um controlo ecográfico rígido para maximizar a aceleração providenciada pela terapia, ao mesmo tempo que se evita a recorrência lesional por excesso de carga aplicada no tecido em reparação. Nos casos de sucesso observados não se estabeleceram datas fixas para os controlos ecográficos, sendo alguns efectuados mais precocemente por curiosidade sobre a actuação da terapia com PRP, e outros devido a variáveis relacionadas com os proprietários.

Após observação e participação na sua formulação e administração, concluí que a terapia com PRP se encontra adaptada ao ambiente clínico, e que a técnica manual de obtenção é simples e de execução relativamente fácil, não descurando o conhecimento técnico necessário para conseguir obter um produto estéril e executar a técnica com elevado índice de reprodutibilidade. Através da observação dos casos clínicos e tendo em conta todas as variáveis derivadas dos animais e do próprio tratamento, conclui-se que neste grupo reduzido de animais foi possível obter relativamente bons resultados em lesões tendinosas e ligamentosas com a aplicação intralesional de PRP comparativamente aos resultados descritos por Jorgensen et al. (2011) e McIlwraith (2002) para os tratamentos convencionais. Foram considerados bons resultados tempos de recuperação reduzidos, boas características ultrassonográficas em curtos espaços de tempo, e a possibilidade do equino retornar ao prévio desempenho desportivo com uma menor probabilidade de recorrência lesional.

Existem métodos ultrassonográficos recentes e mais complexos que permitem uma mais fácil caracterização e interpretação da lesão, assim como da sua evolução durante a recuperação. No entanto, a ultrassonografia continua a ser o exame imagiológico ideal para a monitorização da lesão durante a recuperação do animal, de modo a otimizar o seu progresso, contribuindo assim para a minimização da recorrência lesional. Quantificar a imagem ecográfica utilizando a ecogenicidade, FAS e a CSA de uma lesão providencia um meio eficaz para interpretar lesões tendinosas e ligamentosas, e os valores obtidos podem também ser utilizados para classificar a lesão e monitorizar objectivamente o processo de reparação. A classificação categórica das lesões não foi realizada nestes casos clínicos, porque a necessidade de um exame ecográfico rápido e conciso se sobrepôs à necessidade de um exame objectivamente descritivo. Este é um retrato comum na clínica de equinos, onde os mv raramente descrevem de modo extensivo as lesões com que se deparam ao longo da sua prática. Deste modo, mesmo sendo o PRP aplicado em contexto clínico há vários anos, são poucos os estudos que contêm evidências ecográficas concretas da eficácia desta terapia em afecções tendinosas e ligamentosas de equinos, sendo por isso ainda muito pouco utilizada na MV em Portugal. Através da caracterização ultrassonográfica seria mais fácil a interpretação das imagens ecográficas e a sua comparação entre clínicos, e permitiria ao mv reportar os resultados obtidos após aplicação de uma determinada terapia.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abellanet, I. & Prades, M. (2009a). Intraarticular platelet rich plasma (PRP) therapy: Evaluation in 42 sport horses with OA. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/72.pdf?LA=1>
- Abellanet, I. & Prades, M. (2009b). Repeated intralesional platelet rich plasma (PRP) injection evaluated in 72 sport horses with superficial flexor tendon injuries improves clinical scores and return to performance. In *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/102.pdf?LA=1>
- Araújo, L.M., Júnior, P.V.M., Panza, A. & Ramos, C.M.G. (2009). Use of platelet-rich plasma (PRP) in a cranial tibial tendon lesion of a 'three barrels' appaloosa mare. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/95.pdf?LA=1>
- Barbosa, A.L.T., Carlo, R.J.D., Gomes, H.C., Oliveira, A.C., Monteiro, B.S. & Carlo, N.D. (2008). Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. *Ciência Rural*, 38(5), 1335-1340
- Bosch, G., Weeren, P.R.V., Barneveld, A. & Schie, H.T.M.V. (2011). Computerised analysis of standardized ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *The Veterinary Journal*, 187, 92-98. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/tvjl>
- Carmona, J.U., Argüelles, D., Climent, F. & Prades, M. (2007). Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: A preliminary pilot clinical study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(4), 167-170
- Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, C.E., Hendren, D.G. & Kane, C.J.M. (2003). Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*, 74, 244-255
- Cissell, J.M. (2009). *In vitro equine flexor tendonitis: New model development and therapeutic investigation*. Master of Science in Biomedical and Veterinary Sciences Thesis. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute
- Clegg, P. (2008). Tissue engineering of tendon. *Proceedings of the 14th Congress of the European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology: Munich, Germany, 10-14 September*, pp.3-5. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/esvot/2008/lecture/clegg.pdf>
- Dabareiner, R.M., Carter, G.K. & Chaffin, M.K. (2000). How to perform ultrasound-guided tendon splitting and intralesional tendon injections in the standing horse. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners: San Antonio, Texas, USA, 26-29 November*, 46, pp.176-179. Acedido a 26 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2000/176.pdf>

- Dahlgren, L.A., Mohammed, H.O. & Nixon, A.J. (2005). Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 84-92
- Dahlgren, L.A. (2007). Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 168-173
- Dahlgren, L.A. (2009). Stem Cell Therapy. In N.E. Robinson & K.A. Sprayberry (Eds.), *Current Therapy in Equine Medicine*. (6th ed.). (pp. 908-911). USA: Saunders Elsevier
- Dowling, B.A., Dart, A.J., Hodgson, D.R. & Smith, R.K.W. (2000). Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 32(5), 369-378. Acedido a 10 Junho, 2011, disponível em: <http://www.vetcellamericas.com/Research/EquineVeterinaryJournal-Superficialdigitalflexortendonitisinthehorse.pdf>
- Dowling, B.A. & Dart, A.J. (2005). Mechanical and functional properties of the equine superficial digital flexor tendon. *The Veterinary Journal*, 170, 184-192
- Dyson, S.J. (1997). Treatment of superficial digital flexor tendinitis: A comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 43, 297-300. Acedido a 10 Junho, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1997/Dyson.pdf>
- Dyson, S.J. (2004). Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Veterinary Journal*, 36(5), 415-419. Acedido a 10 Junho, 2011, disponível em: <http://www.vetcellamericas.com/Research/EquineVeterinaryJournal-Medicalmanagementofsuperficialdigitalflex.pdf>
- Dyson, S.J. (2011a). The deep digital flexor tendon. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 726-733). Missouri: Elsevier Saunders
- Dyson, S.J. (2011b). The metacarpal region. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 411-426). Missouri: Elsevier Saunders
- Fortier, L.A. (2009). Medical therapies for tendonitis. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/447.pdf?LA=1>
- Fortier, L. (2011). Clinical use of stem cells, marrow components, and other growth factors. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 761-764). Missouri: Elsevier Saunders
- Fortier, L.A. & Smith, R.K.S. (2008). Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Veterinary Clinics of Equine Practice*, 24, 191-201
- Foster, T.E., Puskas, B.L., Mandelbaum, B.R., Gerhardt, M.B. & Rodeo, S.A. (2009). Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine*, 37(11), 2259-2272. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://ajs.sagepub.com/content/37/11/2259>

- Gillis, C.L. (1997). Rehabilitation of tendon and ligament injuries. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 43, 306-309. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em <http://www.cevra.org/pdfs/Gillis.pdf>
- Gillis, C. (2004). Soft tissue injuries: tendinitis and desmitis. In K.W. Hinchcliff; A.J. Kaneps & R.J. Geor, *Equine sports medicine and surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete*. (pp. 412-432). Philadelphia: Saunders Elsevier
- Gillis, C. (2007). Ultrasonography for monitoring healing and rehabilitation. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 174-178
- Huard, J., Li, Y., Peng, H. & Fu, F.H. (2003). Gene therapy and tissue engineering for sports medicine [abstract]. *The Journal of Gene Medicine*, 5(2), 93-108. Acedido a 23 Junho, 2011, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.344/abstract>
- Jorgensen, J.S., Genovese, R.L. & Ross, M.W. (2011). Superficial digital flexor tendonitis: Superficial digital flexor tendonitis in racehorses. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 706-715). Missouri: Elsevier Saunders
- Júnior, P.V.M., Araújo, L.M., Panza, A. & Ramos, C.M.G. (2009). Platelet-rich plasma (PRP) in suspensory ligament lesions: Use in three thoroughbred racehorses. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association: Guarujá, Brazil, 24-27 September*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/weva/2009/94.pdf?LA=1>
- Kajikawa, Y., Morihara, T., Sakamoto, H., Matsuda, K., Oshima, Y., Yoshida, A., Nagae, M., Arai, Y., Kawata, M. & Kubo, T. (2008). Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *Journal of Cellular Physiology*, 215, 837-845. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.falloplastica.net/fp/pdf/prp08.pdf>
- Kanthan, S.R., Kavitha, G., Addi, S., Choon, D.S. & Kamarul, T. (2011). Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models [abstract]. *Injury*, 42(8), 782-789
- Kane, J.C.P. & Firth, E.C. (2009). The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses. *The Veterinary Journal*, 181, 79-89
- Landesberg, R., Roy, M. & Glickman, R.S. (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 58, 297-300
- Lin, T.W., Cardenas, L. & Soslowsky, L.J. (2004). Biomechanics of tendon injury and repair. *Journal of Biomechanics*, 37, 865-877
- Maia, L., Souza, M.V., Júnior, J.I.R., Oliveira, A.C., Alves, G.E.S., Benjamin, L.A., Silva, Y.F.R.S., Zandim, B.M. & Moreira, J.C.L. (2009). Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: Histologic evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(8), 618-626
- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62, 489-496. Acedido a 5 Maio, 2011, disponível em: <http://www.falloplastica.net/fp/pdf/prp05.pdf>

- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E. & Georgeff K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85, 638-646. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: http://www.1chirurgie.cz/pool/vzor/download/ACP_Platelet_rich_plasma_growth_factor_enhancement_for_bone_grafts.pdf
- McIlwraith, C.W. (2002). Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In T.S. Stashak, *Adams' lameness in horses*, (5th edition), (pp. 594-644). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- McLellan, J. & Plevin, S. (2011). Evidence-based clinical question: Does it matter which platelet-rich plasma we use. *Equine Veterinary Education*, 23(2), 101-104
- Mishra, A., Tummala, P., King, A., Lee, B., Kraus, M., Tse, V. & Jacobs, C. (2009). Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Engineering*, 15(3), 431-435
- Molloy, T., Wang, Y. & Murrell, G.A.C. (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5), 381-394
- Monteiro, S. (2008). Wound cicatrization and platelet rich plasma. *Proceedings of the 14th Congress of the European Society of Veterinary Orthopaedics and Traumatology: Munich, Germany, 10-14 September*. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/esvot/2008/la/Monteiro.pdf>
- Pietrzak, W.S. & Eppley, B.L. (2005). Platelet rich plasma: Biology and new technology. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 16, 1043-1054. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: http://www.1chirurgie.cz/pool/vzor/download/Platelet_Rich_Plasma_Biology_and_New_Technology.pdf
- Prades, M. (2007). Current trends in regenerative medicine for soft tissue musculo-skeletal injury. *Proceedings of Southern European Veterinary Conference: Barcelona, Spain, 19-21 October*. Acedido a 18 Abril, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2007/prades2/chapter.asp?LA=1>
- Ramírez, J.U.C. (2006). *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse: Preliminary clinical studies and cellular and molecular evaluation of equine platelet concentrates obtained by single and double centrifugation tube methods*. Ph.D. Thesis. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona
- Rantanen, N.W., Jorgensen, J.S. & Genovese, R.L. (2011). Ultrasonographic evaluation of the equine limb: technique. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 182-205). Missouri: Elsevier Saunders
- Reef, V.B. (1998). *Equine diagnostic ultrasound*. Philadelphia: W.D. Saunders
- Reef, V.B. & Genovese, R.L. (2011). Soft tissue injuries of the pastern. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 810-817). Missouri: Elsevier Saunders

- Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D. & Smith, R. (2007). Stem cells in veterinary medicine: Attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology*, 9, 409-416. Acedido a 10 Junho, 2011, disponível em: <http://vetcell.com/assets/Research-papers/Stem-Cells-in-Veterinary-Medicine.pdf>
- Ross, M.W. (1997). Surgical management of superficial digital flexor tendinitis. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 43, 291-296. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/1997/Ross.pdf>
- Ross, M.W. (2011). Superficial digital flexor tendonitis: Surgical management of superficial digital flexor tendonitis. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 715-721). Missouri: Elsevier Saunders
- Santos, J.L., Pandita, D., Rodrigues, J., Pêgo, A.P., Granja, P.L. & Tomás, H. (2011). Non-viral Gene Delivery to mesenchymal stem cells: Methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Current Gene Therapy*, 11, 46-57. Acedido a 23 Junho, 2011, disponível em: http://www.pedrogranja.net/publics/Santos_CurrGeneTher11.pdf
- Schnabel, L.V., Mohammed, H.O., Miller, B.J., McDermott, W.G., Jacobson, M.S., Santangelo, K.S. & Fortier, L.A. (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, 25, 230-240. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.innovativeanimalproducts.com/pdf/PRP%20enhances%20anabolic%20gene%20expression%20in%20flexor%20digitorum%20superficialis%20tendons.pdf>
- Sharma, P. & Maffulli, N. (2005). Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon*, 3(5), 309-316
- Silva, P.S.A., Carlo, R.J.D., Serakides, R., Monteiro, B.S., Balbinot, P.Z., Eleotério, R.B., Paez, O.L.A. & Vitoria, M.I.V. (2009). Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. *Ciência Rural*, 39, 129-134. Acedido a 20 Agosto, 2011, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n1/a20v39n1.pdf>
- Smith, R.K.W. (2011). Pathophysiology of tendon injury. In M.W. Ross & S.J. Dyson, *Diagnosis and management of lameness in the horse*. (second edition). (pp. 694-706). Missouri: Elsevier Saunders
- Smith, J.J., Ross, M.W. & Smith, R.K.W. (2006). Anabolic effects of acellular bone marrow platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 19, 43-47. Acedido a 2 Maio, 2011, disponível em: <http://www.vetcell.com/assets/Research-papers/Anabolic-effects.pdf>
- Smith, R.K.W. & Goodship, A.E. (2004). Tendon and ligament physiology. In K.W. Hinchcliff; A.J. Kaneps & R.J. Geor, *Equine sports medicine and surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete*. (pp. 130-151). Philadelphia: Saunders Elsevier
- Sutter, W.W. (2007). Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 198-208
- Textor, J.A., Norris, J.W. & Tablin F. (2011). Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *American Journal of Veterinary Research*, 72(2), 271-278

- Vidriero, E.L., Goulding, K.A., Simon, D.A., Sanchez, M. & Johnson, D.H. (2010). The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: Optimizing the healing environment. *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 26(2), 269-278
- Wang, J.H.C. (2006). Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomechanics*, 39, 1563–1582
- Wroblewski, A.P., Mejia, H.A. & Wright, V.J. (2010). Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20, 98-105
- Zhang, G., Young, B.B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L.J., Chakravarti, S. & Birk, D.E. (2005). Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 5(1), 5-21. Acedido a 25 Setembro, 2011, disponível em: <http://www.ismni.org/jmni/pdf/19/04BIRK.pdf>

VI. ANEXOS

Anexo 1. Total de cirurgias observadas na clínica *Hippiatrica Equine Medical Center*

Tipo de Intervenção	Cirurgia	Número de Casos
Sistema integumentário	Extirpação de massa tumoral subcutânea	1
Sistema gastrointestinal	Laparotomia exploratória	3
Sistema reprodutor	Orquiectomia bilateral electiva	3
	Orquiectomia bilateral terapêutica	2
Sistema respiratório	Ventriculectomia	1
Sistema músculo-esquelético	Redução de fractura do terceiro metacarpo	1
	Redução de fractura da segunda falange com artrodese da articulação interfalângica proximal	1
	Remoção de exostose	2
	Artroscopia da articulação tarsocrural	3
	Tenoscopia da bainha digital com remoção de aderências	1
	Splitting e administração intralesional de PRP*	5
	Administração intralesional tendinosa de PRP (estação)*	1
Total		24

* 5 em 6 aplicações de PRP efectuadas em tendinites do TFDS

Anexo 2. Protocolo genérico de preparação e aplicação de PRP da clínica *Hippiatrica Equine Medical Center*

Materiais:

- Tubos de citrato
- Tubos de soro secos
- Suporte para tubos
- Várias seringas e agulhas
- Cateter Butterfly
- Spray de solução com álcool e clorhexidina
- Tosquiadora eléctrica
- Centrífuga
- Material para desinfecção cirúrgica
- Sedativos

O volume das seringas e dos tubos utilizados depende da quantidade de PRP que se pretende produzir, tendo em conta que com esta técnica se obtém cerca de 10% do volume de sangue extraído em PRP. As características do produto obtido através deste método encontram-se parcialmente descritas no capítulo 3.5.2.

Método

- Proceder à tricotomia e à desinfecção cirúrgica do local onde se realiza a punção da veia jugular;
- Proceder à tricotomia do membro a intervir;
- Preparar numa mesa um campo asséptico;
- Acomodar os tubos no suporte respectivo e colocar este sobre a mesa;
- Realizar a venipunção com o catéter Butterfly, extraindo sangue para duas seringas estéreis;
- Colocar uma agulha em cada seringa e encher os tubos de citrato;
- Centrifugar os tubos a 120g durante 5 minutos;
- Retirar os tubos da centrífuga e extrair 50% do sobrenadante adjacente à camada flogística de cada tubo, usando uma seringa e agulha estéreis;
- Transferir o sobrenadante obtido para os tubos de soro secos;
- Centrifugar a 240g os tubos de soro secos durante 5 minutos;
- Retirar os tubos da centrífuga e extrair 1 ml do fundo (que contém o *pellet* de plaquetas) de cada tubo, usando seringa e agulhas estéreis;
- Aplicar o PRP na estrutura afectada;
- Aplicar uma ligadura compressiva;
- Adequar um plano de reabilitação ao paciente.

Anexo 3. Protocolo de reabilitação após terapia com PRP da clínica ***Hippiatrica Equine Medical Center***

Semanas:

1. Caminhar à mão a passo, de manhã e de tarde.
2. Caminhar montado a passo, duas vezes ao dia.
3. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo e trote, finalizando a passo.
4. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo e trote, finalizando a passo.
5. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo e trote, finalizando a passo.
6. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo, trote e galope, finalizando a passo.
7. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo, trote e galope, finalizando a passo.
8. Caminhar montado a passo, seguido de uma sessão intercalada entre passo, trote e galope, finalizando a passo.

Nota: da semana 3 à 8 é incrementado de forma gradual o tempo de cada andamento nas sessões intercaladas, e também o tempo da sessão de finalização.